

**Erzeugung von *Symphytum*-Haarwurzelkulturen mit
verringelter Alkaloidbiosynthese zur Produktion bioaktiver
Metabolite**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. Nat.)

vorgelegt
dem Bereich Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden
von

Dipl. pharm. Annemarie Lippert
geboren am 23.1.1985 in Dresden

Erster Gutachter: Prof. Dr. Jutta Ludwig-Müller
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Michael Göttfert

eingereicht am 22.3.2019
verteidigt am 20.6.2019

Die Versuche wurden in der Zeit von Januar 2010 bis August 2017 im Institut für Botanik durchgeführt.

Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an Frau Professor Ludwig-Müller, die mir dieses Thema anvertraut hat, obwohl ich aus einer anderen Fachrichtung komme und gerade im Bereich der Molekularbiologie einiges nachzuholen hatte. Sie hat diese Arbeit mit Rat und Geduld begleitet und mich ermutigt, mein Projekt auf nationalen und internationalen Tagungen vorzustellen. Ihre Einweisung in die Analysengeräte und die stete Bereitschaft, die Ergebnisse zu diskutieren und mit ihrer Erfahrung zu begleiten waren mir eine große Hilfe.

Herrn Professor Göttfert danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit und für das Gespräch zu Beginn, das mir geholfen hat, mich für eine Richtung zu entscheiden.

Ein großes Dankeschön geht an das Kollegium im Institut für Botanik, für Ratschläge und Materialaustausch auch über Arbeitsgruppengrenzen hinweg sowie lustige und manchmal tröstliche Pausengespräche. Vielen Dank an die Arbeitsgruppe Pflanzenphysiologie für die gute Zusammenarbeit und angenehme Atmosphäre innerhalb und außerhalb des Labors. Bei Euch fand ich jederzeit ein offenes Ohr oder eine helfende Hand. Ohne Dr. Antje Walter und Madeleine Neumann wären die Mittagsrunden nicht dieselben gewesen.

Dr. Sabine Jülke danke ich für die gründliche Einweisung in die Laborbraxis rund um DNA und Bakterientransformation und so manchen Rat aus ihrem reichen Erfahrungsschatz.

Ich danke Dr. Joachim Püschel für die Orientierungshilfe beim Start an der TUD und viele Diskussionen gerade in der Anfangszeit unserer jeweiligen Projekte. Und Deine Hinweise zu den Eigenheiten des GC-MS-Geräts, als schließlich die Reihe an mir war, damit zu messen, waren unbezahlbar.

Starthilfe bei der Arbeit mit RNA und der quantitativen PCR bekam ich von Sabine Marschollek, Dr. Susann Auer und Dr. Linda Jahn. Ihr habt mir eine schnelle Orientierung ermöglicht und wart stets bereit, mit mir Pläne und Ergebnisse zu diskutieren. Ein besonderes Dankeschön geht dabei an Linda, die über lange Jahre eine sehr angenehme Büronachbarin war und oft meine erste Anlaufstelle, wenn ich jemanden zu Zuhören und Diskutieren oder einfach ein zweites Paar Augen brauchte. Eine große Hilfe war mir auch die Erstdurchsicht dieser Arbeit.

Freia Bennade, Sabine Rößler und Maria Helbig haben sich liebevoll um meine Wurzeln gekümmert und umgesetzt, wenn ich das gerade nicht selbst tun konnte.

Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit, gerade auch wenn wir mal wieder alle gleichzeitig den Abzug brauchten.

Ich danke der Nachwuchsforschergruppe im ESF-Projekt „Weiße Biotechnologie mit Pflanzenzellen“, mit dem meine Arbeit begann, für die interessanten Einblicke in andere Fachbereiche und die bereichernden Diskussionen. Ganz besonders Dr. Christiane Haas, die mir zeigte, wie man aus Pflanzen und Agrobakterien Haarwurzeln bekommen kann.

Schließlich und nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich in all den Jahren stets unterstützt hat. Ohne Euch gäbe es diese Arbeit nicht!

Inhalt

1.	Einleitung	1
1.1.	Gattung <i>Symphytum</i> (Beinwell)	1
1.1.1.	Botanik	1
1.1.2.	Inhaltsstoffe und Anwendungen	2
1.2.	Pyrrolizidinalkaloide	3
1.2.1.	Strukturen	3
1.2.2.	Toxizität	5
1.2.3.	Biosynthese von Pyrrolizidinalkaloiden in Pflanzen	8
1.3.	Haarwurzeln als Modellsystem und Sekundärstoffproduzenten.....	11
1.3.1.	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	11
1.3.1.1.	Virulenzgene	13
1.3.1.2.	Onkogene	14
1.3.1.3.	Opinsynthese und -verwertung	15
1.3.2.	Haarwurzelkulturen in der Biotechnologie	15
1.4.	Zielstellung.....	17
2.	Material und Methoden.....	18
2.1.	Materialien	18
2.1.1.	Geräte	18
2.1.2.	Chemikalien	18
2.1.3.	Organismen	19
2.2.	Erzeugung und Kultivierung der pflanzlichen Zell- und Organkulturen.	20
2.2.1.	Co-Kultivierung (<i>S. officinale</i>)	21
2.2.2.	Direktinfektion (<i>S. officinale</i> und <i>S. x uplandicum</i>).....	22
2.2.3.	Kultivierung und Selektion von Haarwurzelkulturen.....	22
2.2.4.	Kallus	24
2.2.5.	Flüssigkultur und Probengewinnung.....	24
2.2.6.	Wachstumsuntersuchungen	25
2.3.	Erzeugung der gentechnisch modifizierten <i>Agrobacterium</i> -Stämme....	26
2.3.1.	Präparation elektrokompenter Zellen.....	26
2.3.2.	Transformation mittels Elektroporation	27
2.3.3.	Generierung der künstlichen microRNA-Konstrukte	28

2.3.3.1.	Grundlagen künstliche microRNA	28
2.3.3.2.	Durchführung	29
2.4.	Qualitative und quantitative Untersuchungen an Nukleinsäuren	33
2.4.1.	Nukleinsäurepräparation	34
2.4.1.1.	Genomische DNA aus <i>Symphytum</i>	34
2.4.1.1.	Plasmidpräparation	35
2.4.1.2.	Reinigung von PCR-Produkten	35
2.4.1.3.	RNA aus <i>Symphytum</i> Haarwurzelkulturen	35
2.4.1.4.	cDNA-Synthese	36
2.4.1.5.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	36
2.4.2.	Gelelektrophorese	36
2.4.3.	Protokolle für die Polymerasekettenreaktion	37
2.4.3.1.	Qualitative Untersuchungen mittels PCR	37
2.4.3.2.	Expressionsuntersuchungen mittels quantitativer PCR	41
2.4.3.3.	Auswertung von qPCR-Daten mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode	42
2.4.3.4.	Bestimmung der <i>HSS</i> -Expression mittels absoluter Quantifizierung	44
2.5.	Sekundärstoffanalytik	46
2.5.1.	Allantoinbestimmung	46
2.5.1.1.	Probenaufbereitung.....	46
2.5.1.2.	Gehaltsbestimmung mittels HPLC.....	47
2.5.2.	Quantifizierung der Pyrrolizidinalkaloide.....	49
2.5.2.1.	Kalibrierung.....	51
3.	Ergebnisse	55
3.1.	Erzeugung und Untersuchung der Haarwurzelkulturen	57
3.1.1.	Herstellung der Kulturen.....	57
3.1.2.	Wachstum und Biomasseakkumulation.....	61
3.1.2.1.	Längenwachstum.....	62
3.1.2.2.	Seitenwurzelbildung	64
3.1.2.3.	Biomasseakkumulation	66
3.2.	Bestimmung der Expression von <i>HSS</i> und <i>DHS</i> mittels qPCR.....	68
3.2.1.	Methodenetablierung	68
3.2.2.	Expression von <i>HSS</i> und <i>DHS</i> in Haarwurzelkulturen.....	71

3.2.2.1.	<i>DHS</i>	71
3.2.2.2.	<i>HSS</i>	73
3.3.	Analytik von Sekundärmetaboliten	77
3.3.1.	Bestimmung des Allantoingehalts	77
3.3.1.1.	Methodenoptimierung	77
3.3.1.2.	Optimierung der Extraktion.....	79
3.3.1.3.	Allantoingehalt in verschiedenen <i>Symphytum</i> -Proben.....	80
3.3.2.	Bestimmung des Pyrrolizidinalkaloidgehalts.....	84
3.3.2.1.	Methodenoptimierung	84
3.3.2.2.	Auswahl der Proben für Wiederholungsmessungen	87
3.3.2.3.	PA-Gehalt in <i>Symphytum</i> -Proben	88
3.4.	Gibt es einen Zusammenhang zwischen <i>HSS</i> -Expression und Alkaloidgehalt?	92
4.	Diskussion.....	96
4.1.	Erzeugung und Wachstum von <i>Symphytum</i> -Haarwurzelkulturen mit und ohne zusätzliche Transgene	98
4.2.	Produktion von Allantoin in Haarwurzelkulturen	101
4.3.	Beeinflussen die miRNA-Konstrukte die Expression von <i>HSS</i> und <i>DHS</i> ?	103
4.4.	Beeinflußt die Regulation der <i>HSS</i> -Expression den PA-Gehalt?	106
4.5.	Beurteilung der PA-Gehalte in Haarwurzelkulturen	108
4.6.	Ausblick	110
5.	Zusammenfassung.....	112
6.	Verzeichnisse.....	114
6.1.	Abkürzungen.....	114
6.2.	Literatur.....	115
6.3.	Abbildungsverzeichnis.....	129
6.4.	Tabellenverzeichnis	132
7.	Anhang.....	134
7.1.	Längenwachstum von Haarwurzeln.....	134
7.2.	Bestimmung des Allantoingehalts mittels HPLC	135
7.3.	Bestimmung des PA-Gehalts mit GC-MS	138
7.4.	Vergleich der <i>HSS</i> -Expression mit dem PA-Gehalt	144

1. Einleitung

1.1. Gattung *Symphytum* (Beinwell)

1.1.1. Botanik

Der gewöhnliche Beinwell, *Symphytum officinale*, ist eine mehrjährige Staude aus der Familie der Borretschgewächse oder Raublattgewächse (Boraginaceae). Die Pflanze ist in weiten Teilen Europas und Nordasiens beheimatet und kommt verwildert auch in Nordamerika vor (Wichtl 2002). Sie bevorzugt feuchte, nährstoffreiche Standorte (Rothmaler 2002). *S. officinale* erreicht eine Wuchshöhe von 50-150 cm. Die Blätter sind lang und an den Enden verschmälert. Dabei bildet die Blattspreite am Stiel entlanglaufende Säume. Blätter an der Infloreszenzachse sind herablaufend angesetzt. Stengel und Blätter sind borstig behaart. Beinwell blüht von Mai bis Juni. Die Blüten sind in Wickeln angeordnet mit glockig verwachsener, rotvioletter oder gelblichweißer Krone (Rothmaler 2002; Wichtl 2002). Einen Eindruck vermittelt Abbildung 1.



Abbildung 1: Beinwell im Gewächshaus; Topfdurchmesser: 20 cm

Neben *S. officinale*, der Stammpflanze der Arzneidroge (siehe 1.1.2), sind weitere Arten der Gattung *Symphytum* verbreitet und werden teilweise auch genutzt, hauptsächlich als Gründünger und Futterpflanze. Besonders hervorzuheben sind hier *S. asperum* und die Kreuzung der beiden vorgenannten Arten, *S. x uplandicum*. Von letzterer gibt es auch arzneilich genutzte Sorten. Die zahlreichen in der Natur vorkommenden Varietäten und Kreuzungen sind teilweise morphologisch schwer zu unterscheiden, hinzu kommen verschiedene Ploidiegrade. Das macht die Systematik der Gattung *Symphytum* im Detail sehr komplex. Schon in den 80er Jahren wurden chemotaxonomische Untersuchungen durchgeführt. Insbesondere das Pyrrolizidinalkaloid Echimidin kommt generell in *S. asperum* und *S. x uplandicum* vor, während in *S. officinale* nur Einzelfunde bekannt sind. Genauere Informationen zu Systematik und Chemotaxonomie der Beinwellarten finden sich bei Jaarsma et al. (1989).

1.1.2. Inhaltsstoffe und Anwendungen

Beinwell (*Symphytum officinale*) wird schon seit Langem als Heilpflanze genutzt. Die Droge Radix Symphyti enthält nach Wichtl (2002) ca. 0,6-0,8% Allantoin (Abbildung 2), 0,04%-0,6% Pyrrolizidinalkaloide (PA), 4-6% Gerbstoffe und Schleime (überwiegend saure Polysaccharide). Außerdem findet sich ein Saponin mit dem Aglycon Hederagenin (Symphytoxin A) (Ahmad et al. 1993) und Phenolcarbonsäuren, unter anderem Rosmarinsäure (Gracza et al. 1985). Wurzelextrakte zeigen analgetische, antiinflammatorische und abschwellende Wirkung sowie Förderung der Geweberegeneration (Staiger 2012). Die wichtigsten wirksamen Inhaltsstoffe sind dabei wahrscheinlich Allantoin und Rosmarinsäure (Andrès et al. 1989).

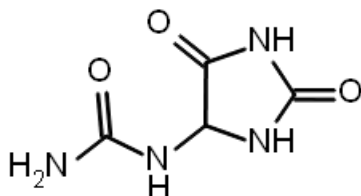


Abbildung 2: Allantoin

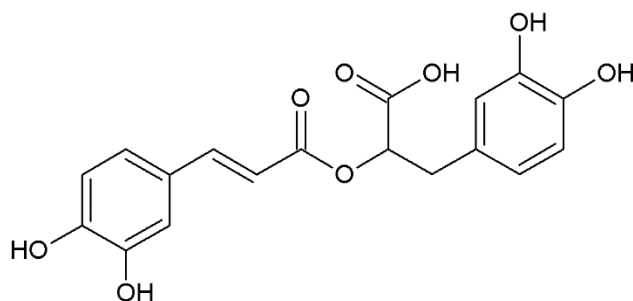


Abbildung 3: Rosmarinsäure

Anwendungsgebiete laut Kommission E¹ sind Prellungen, Zerrungen und Verstauchungen. Die Anwendung darf nur auf intakter Haut erfolgen, wobei die maximal applizierte Dosis auf 100 µg 1,2-ungesättigte Pyrrolizidinalkaloide (siehe 1.2) pro Tag begrenzt ist. Die Anwendungsdauer sollte sechs Wochen im Jahr nicht überschreiten. Davon ausgenommen sind laut Monographie Zubereitungen mit PA-Dosen < 10 µg/d. Volksmedizinisch wurden Beinwellzubereitungen auch innerlich gegen Gastritis und Magen- und Darmgeschwüre angewandt. Dies wird von der Kommission E wegen der durch die PA bedingten Toxizität abgelehnt.

1.2. Pyrrolizidinalkaloide

Neben den erwünschten, für die medizinische Wirkung verantwortlichen Inhaltsstoffen enthält Beinwell auch Pyrrolizidinalkaloide (PA) (Jaarsma et al. 1989; Kim et al. 2001).

Pyrrolizidinalkaloide kommen hauptsächlich in den Familien der Asteraceae (Tribus Senecioneae und Eupatorieae) und Boraginaceae vor. Außerdem wurden sie in den Gattungen *Crotalaria* (Fabaceae) und *Phalenopsis* (Orchidaceae) nachgewiesen (Hartmann & Witte 1995; Reimann et al. 2004).

Ungesättigte PA werden in der Leber durch Cytochrom P 450 Enzyme zu mutagenen und potentiell kanzerogenen Metaboliten umgesetzt (siehe 1.2.2). Damit ist eine Einnahme von Beinwellzubereitungen nicht ratsam und die äußere Anwendung auf stumpfe Verletzungen bei intakter Haut beschränkt.

1.2.1. Strukturen

Die Grundstruktur der PA ist die Necinbase, ein in Position C1 hydroxymethylsubstituiertes Pyrrolizidin. Bei der häufigsten Base Retronecin ist in Position C7 eine weitere Hydroxylgruppe zu finden. Neben Retronecin (Abbildung 4) und dessen Stereoisomer Heliotridin gibt es noch weitere Strukturvarianten der Necinbase (Fu et al. 2004 und Römpp online²), die jedoch für diese Arbeit nicht bedeutsam sind.

Eine oder beide Hydroxylfunktionen der Necinbase sind mit Necinsäuren verestert. Dies sind verzweigte Mono- oder Dicarbonsäuren, die sich von Aminosäuren ableiten (Hartmann & Witte 1995). Daraus ergibt sich eine große Strukturvielfalt.

¹ Bundesanzeiger Nr. 138 vom 27.07.1990

² Römpp Lexikon der Chemie, Georg Thieme Verlag,
<https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/Welcome.do>, Abruf 11.10.2017

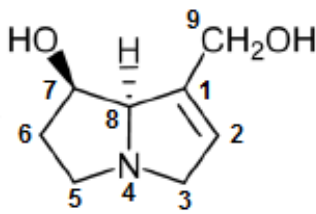


Abbildung 4: Retronecin

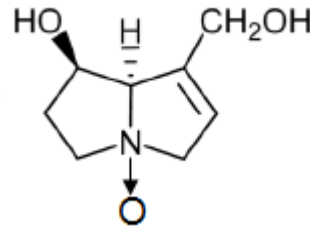


Abbildung 5: Retronecin-N-Oxid.

Derzeit sind über 350 verschiedene Strukturen in mehr als 6000 Spezies bekannt (Smith & Culvenor 1981), die sich verschiedenen Grundtypen zuordnen lassen (Abbildung 6). Die meisten bekannten Pyrrolizidinalkaloide sind 1,2-ungesättigt, was für die Toxizität bedeutsam ist (siehe 1.2.2). In der Pflanze sind PA überwiegend in Form ihrer N-Oxide zu finden (siehe Abbildung 5).

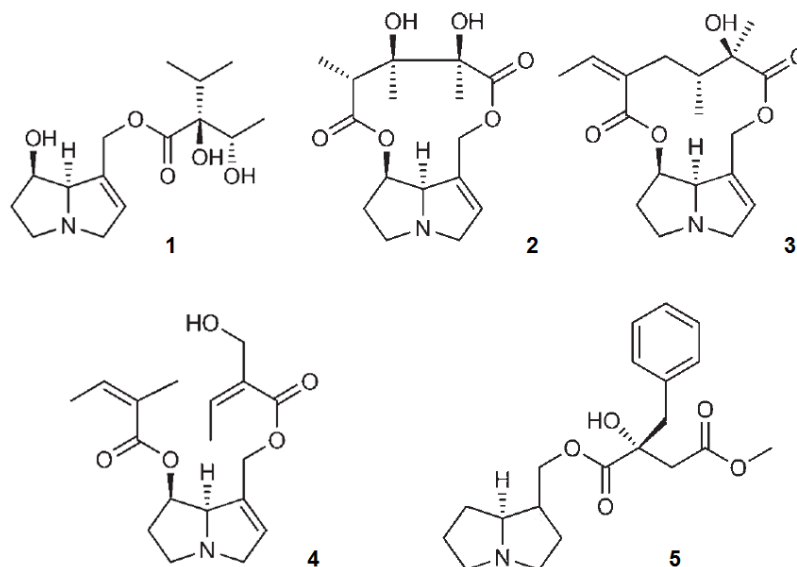


Abbildung 6: Strukturen von Pyrrolizidinalkaloiden. Abgebildet sind die Grundstrukturen wichtiger Gruppen von Pyrrolizidinalkaloiden. 1-4 enthalten Retronecin als Grundstruktur; 1 Lycoposaminotyp, 2 Monocrotalintyp, 3 Senecionintyp, 4 Triangularintyp, 5 Phalenopsintyp mit dem Necin Isoretronecanol; die Zusammenstellung ist beispielhaft, es gibt noch zahlreiche weitere Strukturvarianten

Hauptalkaloide von *S. officinale* sind Lycoposamin, Acetyllycoposamin und Symphytin (Triangularintyp-PA) (Jaarsma et al. 1989). Grundstruktur dieser und weiterer, in geringeren Mengen enthaltener PA (Wuilloud et al. 2004) ist Retronecin. Das Vorkommen von Heliotridin-PA (z.B. Lasiocarpin) wurde zwar postuliert, konnte aber nicht bestätigt werden (Röder 1995). Neuere Aufsätze zitieren zu dieser Frage direkt oder indirekt diese oder ältere Quellen (Liu et al. 2009; Rode 2002). Aktuelle analytische Messungen konzentrieren sich auf 1-2

Hauptalkaloide und ggf. deren N-Oxide, ohne nach weiteren, eventuell in geringer Menge vorhandenen Stoffen zu suchen (Liu et al. 2009; Mudge et al. 2015). Es gibt keine aktuellen Untersuchungen zu Heliotridin-Typ-PA in Beinwell. Auf Grundlage der älteren Literatur sind diese in Beinwell nicht oder nur in sehr geringer Menge zu erwarten, was für die in dieser Arbeit verwendete Analysenmethode bedeutsam ist (siehe 2.5.2).

1.2.2. Toxizität

Pyrrrolizidinalkaloide sind toxisch für Wirbeltiere und Insekten. Das Ausmaß dieser Toxizität variiert stark zwischen verschiedenen Spezies (siehe unten). Unter Insekten sind auch Anpassungen an PA-haltige Futterpflanzen bis hin zur Akkumulation der Alkaloide zum Schutz vor Fraßfeinden bekannt (Details siehe Hartmann (1999)). In Wirbeltieren wirken PA akut und chronisch hepatotoxisch. Seit dem frühen 20. Jahrhundert sind zahlreiche Vergiftungsfälle sowohl von Menschen als auch von Weidetieren bekannt. Ursache von Vergiftungen beim Menschen sind zumeist mit Samen von PA-haltigen Unkräutern verunreinigtes Getreide oder die Verwendung PA-haltiger Pflanzen als Küchenkräuter, Tee oder Heilmittel durch Verwechslung oder in Unkenntnis der Giftigkeit. Geringe Mengen PA können auch in Honigen gefunden werden und in die Milch von Weidetieren übergehen (Überblick in Culvenor & Tandon (1988)). Schwerpunkt dieses Abschnittes sind Toxizität und Metabolismus der PA in Säugetieren, vor allem im Menschen.

Akute Vergiftungen führen zu nekrotischen Veränderungen der Leber bis hin zum Leberversagen. Chronisch schädigen PA die Leber- und Lungenvenen (Lebervenenverschußkrankheit), was zu Störungen der Leberfunktion und darauf folgend zu Leberzirrhose sowie zu pulmonaler arterieller Hypertonie führen kann (Györik & Stricker 2009). Zudem sind sie plazentagängig und teratogen (Peterson & Jago 1980; Rasenack et al. 2003). Besonders problematisch, gerade bei der chronischen Aufnahme sehr geringer Mengen, ist das mutagene und kanzerogene Potential der PA, da dieses zu einer kumulativen Wirkung führt.

Die Toxizität ist an bestimmte Strukturelemente geknüpft. Voraussetzung für die Bildung toxischer Metabolite, die im Folgenden beschrieben wird, sind eine Doppelbindung zwischen C1 und C2, eine Hydroxylgruppe an C7 und die Veresterung wenigstens einer Hydroxylgruppe (C7 oder C9, Abbildung 4). Die Veresterung beider Hydroxylgruppen steigert die Toxizität (Winter & Segall 1989).

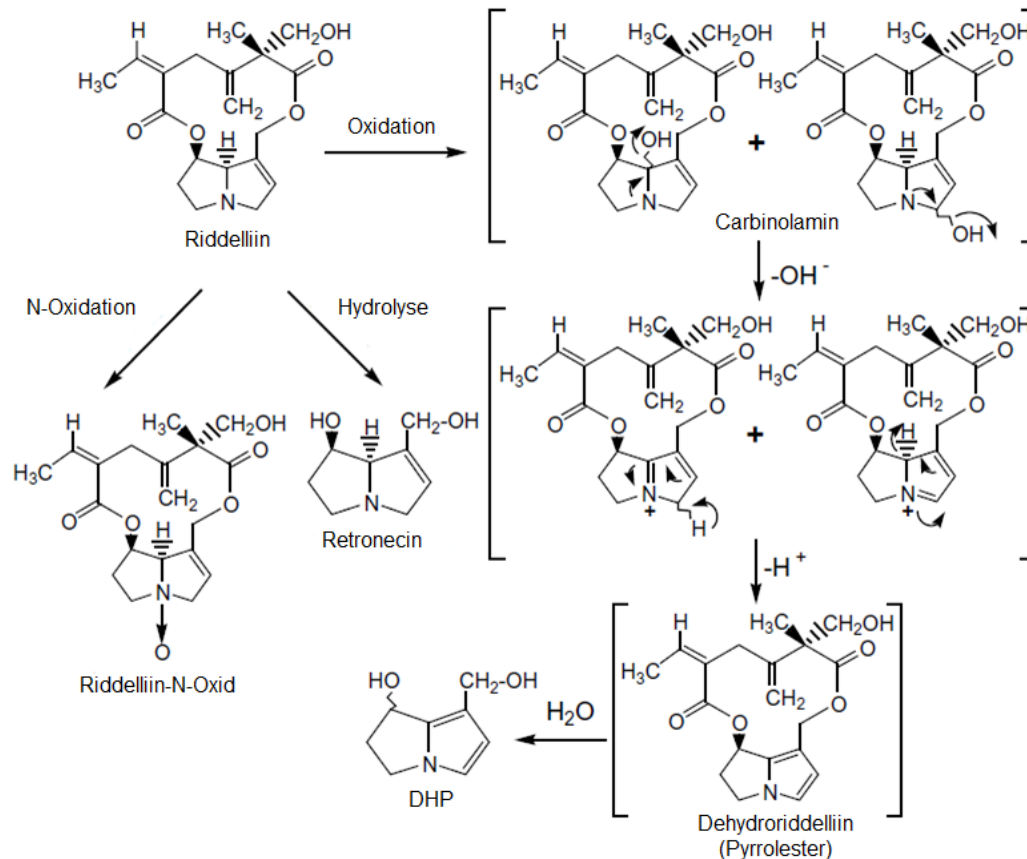


Abbildung 7: Phase I Metabolismus von Pyrrolizidinalkaloiden. (Fu et al. 2004) Die Abbildung zeigt Phase I-Reaktionen von Pyrrolizidinalkaloiden am Beispiel von Riddelliin, einem typischen Retronecin-PA; DHP: (+/-)6,7-Dihydro-7-hydroxy-1-hydroxymethyl-5H-pyrrolizine

Ein sehr detaillierter Übersichtsartikel zur Giftung³ der PA findet sich bei Fu et al. (2004). An dieser Stelle wird der Metabolismus knapp geschildert. Entscheidend für das Ausmaß der Toxifizierung ist das Verhältnis der Phase I-Reaktionen (Abbildung 7). Die Hydrolyse durch Carboxylesterasen führt zu ungiftigen Produkten (Mattocks 1981, 1982). Ob diese Reaktion bevorzugt abläuft, ist abhängig von der Enzymausstattung des Lebewesens, was teilweise die großen Speziesunterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber PA erklärt, sowie der Struktur der Necinsäuren. Stark verzweigte Ketten erschweren die Reaktion. Ein weiterer Weg, der zu ungiftigen Produkten führt, ist die Reaktion zu N-Oxiden durch flavinabhängige Monooxygenasen und Cytochrom P450-Enzyme, hauptsächlich aus der CYP 2D-Gruppe (Miranda et al. 1991). Die N-Oxide aus der Pflanze werden im Darm zu den korrespondierenden PA reduziert (Mattocks 1971), weshalb sie, obwohl selbst ungiftig, toxikologisch relevant sind. In

³ Umwandlung nicht toxischer in toxische Substanzen durch Prozesse der Biotransformation von Xenobiotica

geringerem Umfang ist auch die Reduktion der N-Oxide in der Leber möglich (Powis et al. 1979). Damit ist die N-Oxidation im Organismus reversibel. Die Produkte dieses Entgiftungsweges können noch in toxische Produkte überführt werden.

Problematisch ist die Pyrrolbildung durch Cytochrom P450-Enzyme, im Menschen hauptsächlich durch CYP 3A4 (Miranda et al. 1991). Die entstehenden hochreaktiven Produkte können Proteine und DNA quervernetzen (Eastman et al. 1982; Kim et al. 1995; Xia et al. 2003; Yang et al. 2001), was die Zellfunktion beeinträchtigt und Mutationen auslösen kann. Typisch ist der Austausch von G:C zu T:A. Es treten auch Strangbrüche und der Austausch von Chromatiden auf (Chen et al. 2010). Individuelle Unterschiede in der Enzymaktivität (schnelle oder langsame Metabolisierer) können Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber PA verursachen.

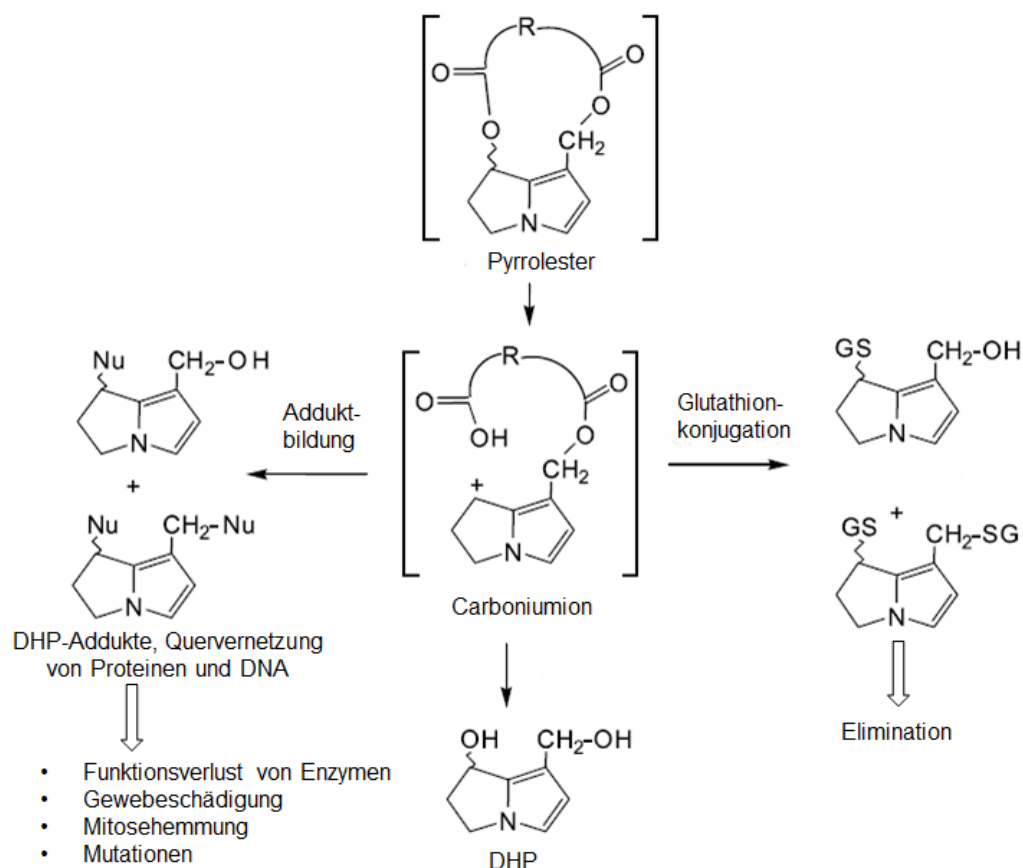


Abbildung 8: Reaktionen von Pyrroleestern *in vivo*. (Fu et al. 2004) Es bilden sich mesomeriestabilisierte Carboniumionen, die mit nukleophilen Gruppen (z.B. -SH) in Proteinen und Nukleinsäuren Addukte bilden können. Dies führt zu Funktionsverlust und bei PA mit zwei veresterten OH-Gruppen zu Quervernetzungen, was die toxischen Effekte und die Mutagenität und Kanzerogenität verursacht.

Die Entgiftung der reaktiven Pyrrolderivate ist durch Konjugation mit Glutathion möglich (Phase II; Übersicht siehe Abbildung 8) (Fu et al. 2004; Pan et al. 1993). Die dafür benötigten Glutathion-S-Transferasen sind eine Gruppe von Isoenzymen mit verschiedenen, überlappenden Substratspezifitäten (Jakobsson et al. 2000). Auch an dieser Stelle ist eine unterschiedliche Enzymausstattung als Ursache für Unterschiede in der Empfindlichkeit zwischen verschiedenen Personen und Spezies anzunehmen. Allerdings findet sich in Hänsel & Sticher (2007) die Aussage, dass auch die Glutathionkonjugate der Pyrrolderivate hochreaktive Elektrophile sind. In der neueren Literatur gibt es Hinweise auf Cysteinkonjugate, die mit nukleophilen Gruppen reagieren können (He et al. 2016). Die Elimination der PA und ihrer Metabolite erfolgt überwiegend renal⁴.

1.2.3. Biosynthese von Pyrrolizidinalkaloiden in Pflanzen

Der erste spezifische Schritt in der Biosynthese der Pyrrolizidinalkaloide ist die Synthese von Homospermidin aus Putrescin und Spermidin oder einem weiteren Molekül Putrescin durch das Enzym Homospermidinsynthase (HSS) (Böttcher et al. 1993). Aus Homospermidin wird über mehrere Schritte die Necinbase aufgebaut (siehe Abbildung 9). Diese wird anschließend mit Necinsäuren verestert, die von Isoleucin, Leucin, Threonin oder Valin abgeleitet sind (Hänsel and Sticher (2007), Übersicht in Röder (1995)).

HSS ging aus einer Duplikation der Deoxyhypusinsynthase (DHS) hervor, eines wichtigen Enzyms des Primärstoffwechsels (Ober & Hartmann 1999). DHS katalysiert den ersten der beiden Schritte zur Aktivierung des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors 5A (eIF5A). Ein Lysinrest der Vorstufe wird posttranslational zu Deoxyhypusin und schließlich zu Hypusin modifiziert (Park et al. 1996), was für die Funktionalität essentiell ist (Park et al. 1993). DHS ist ubiquitär in Eukaryoten und Archaeobakterien (Chen & Liu 1997). Beide Enzyme katalysieren die gleiche Reaktion, die Übertragung einer Aminobutyleinheit von Spermidin auf das jeweilige Substrat – den Lysinrest durch DHS, Putrescin durch HSS. DHS kann beide Reaktionen katalysieren, HSS nur die Bildung von Homospermidin (Ober & Hartmann 1999). Die Enzyme sind homolog und auch die cDNA-Sequenzen der entsprechenden Gene (GenBank-Nummern AJ704851.1 und AJ704852.1) weisen eine Sequenzidentität von 72% auf (NCBI BLAST). Das erfordert beispielsweise eine sehr sorgfältige Auswahl von Primersequenzen, um die Spezifität zu gewährleisten.

⁴ über die Niere

Die Biosynthese findet in zahlreichen Pflanzen (besonders gut untersucht in *Senecio*-Arten) in den Wurzeln statt. Es folgen Transport und Verteilung in oberirdische Pflanzenorgane. Für *Senecio*-Arten ist bekannt, dass in den oberirdischen Organen Strukturmodifikationen erfolgen, die zur großen Vielfalt der PA in der Pflanze beitragen (Hartmann & Dierich 1998). Es gibt keine Hinweise auf einen Abbau der PA durch Pflanzen. In Beinwell wurde HSS in der Endodermis der Wurzel und in Blättern direkt unterhalb sich entwickelnder Infloreszenzen nachgewiesen (Niemüller et al. 2012), was auf die Biosynthese des PA-Grundkörpers in diesen Organen hinweist. Außerdem wurde HSS in jungen Blättern, die direkt neben Infloreszenzen mit Blütenknospen oder gerade geöffneten Blüten saßen, nachgewiesen (Kruse et al. 2017).

Für die Notwendigkeit eines gewissen Differenzierungsgrades der Gewebe, in denen die Biosynthese stattfindet spricht auch, dass Kalluskulturen von *S. officinale* die Bildung von PA einstellen (Huizing et al. 1983). Aus diesen Kulturen regenerierte Pflanzen hingegen bilden PA.

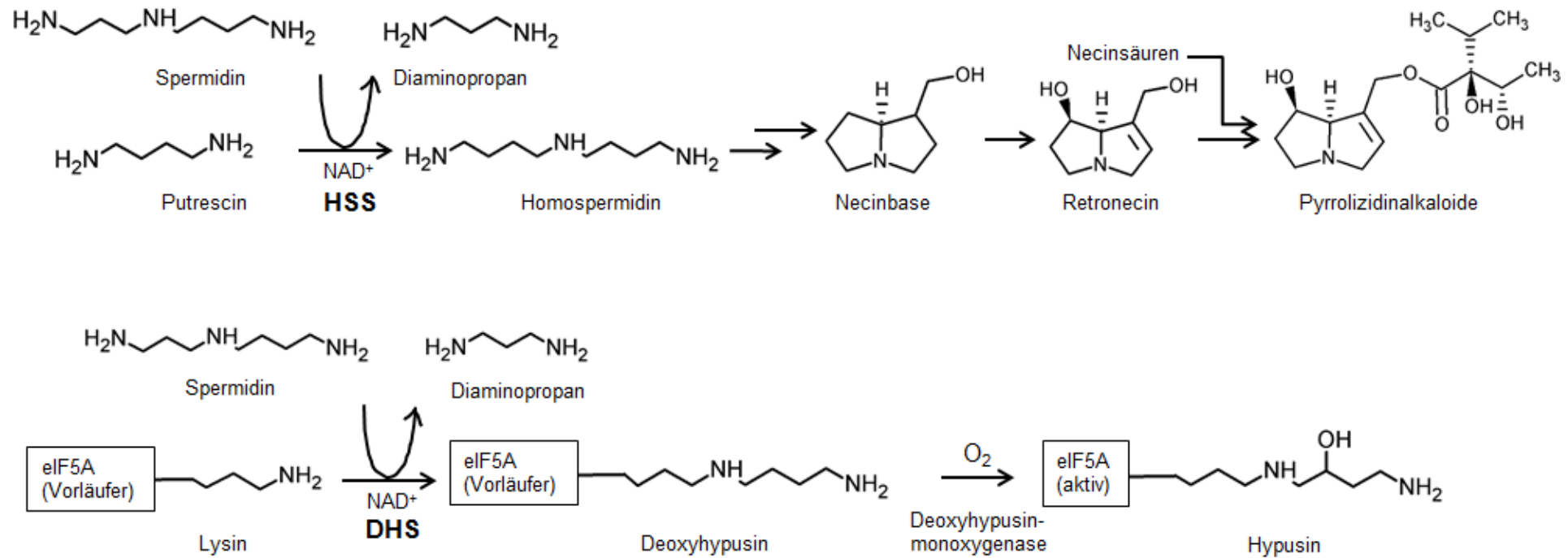


Abbildung 9: Biosynthesereaktionen durch HSS und DHS. (modifiziert nach Ober & Hartmann 1999) Im oberen Teil der Abbildung ist schematisch die Biosynthese der Pyrrolizidinalkaloide dargestellt. Dabei wird der erste Schritt, die Reaktion von Putrescin zu Homospermidin, vom Enzym Homospermidinsynthase (HSS) katalysiert. Darunter ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors eIF5A dargestellt. Dabei wird durch Deoxyhypusinsynthase (DHS) ein Lysinrest zu Deoxyhypusin verlängert. Die Enzyme DHS und HSS katalysieren die gleiche Reaktion, nur an verschiedenen Substraten.

1.3. Haarwurzeln als Modellsystem und Sekundärstoffproduzenten

Haarwurzeln (englisch „*hairy root*“) sind pflanzliche Organkulturen, die durch Transformation von Pflanzengewebe mit *Agrobacterium rhizogenes* erzeugt werden. Es handelt sich um schnell und ohne Hormonzusätze im Medium wachsende Wurzeln. Diesen fehlt der normale Gravitropismus, weshalb sie auf dem Agar entlangwachsen und an Gefäßwänden hochkriechen. Die meisten Kulturlinien zeigen eine starke Bildung von Wurzelhaaren. Haarwurzelkulturen können als Modellsysteme für Wurzeln und Sekundärstoffproduzenten eingesetzt werden.

1.3.1. *Agrobacterium rhizogenes*

Agrobacterium rhizogenes ist ein gramnegatives Bodenbakterium und Auslöser der Haarwurzelkrankheit (Rieker et al. 1930). Dabei kommt es nach Verwundung der Pflanze zur Bildung zahlreicher Adventivwurzeln mit verändertem Phänotyp (fehlender Gravitropismus, starke Wurzelhaarbildung; siehe Abbildung 10 und Abbildung 26). Eng verwandt ist *Agrobacterium tumefaciens*, das die Bildung undifferenzierter Tumore (Wurzelhalstumore) verursacht. In jüngerer Literatur werden die *Agrobacterium*-Arten den Rhizobien zugeordnet (*Rhizobium rhizogenes* und *Rhizobium radiobacter*). In Young et al. (2001) wird auf Grundlage der 16S rDNA eine Systematik entworfen, die unabhängig vom durch Plasmide bestimmten (und somit variablen) pathogenen Verhalten ist. In der vorliegenden Arbeit werden bewusst die älteren Namen der Organismen verwendet, da für die biotechnologischen Arbeiten die Funktionalität der Plasmide entscheidend ist.

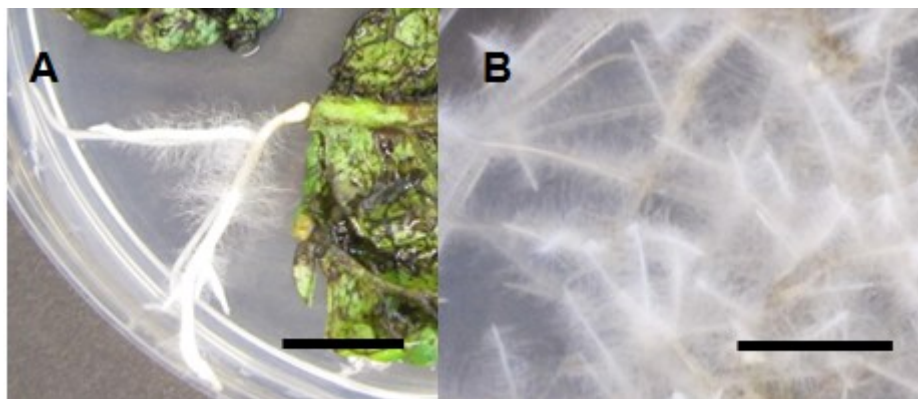


Abbildung 10: Blattexplantat und Haarwurzeln von *S. officinale*. A: Blattexplantat mit einer Wurzelstruktur, die aus einer inokulierten Wunde wächst; B: Ausschnitt aus einer mit Haarwurzeln bewachsenen Petrischale mit MS-Agar; Balken: 1 cm

Beide Arten infizieren verwundetes Pflanzengewebe und übertragen ein Stück DNA von ca. 20 Kilobasen (kb) Größe (Transfer-DNA, T-DNA) in die Pflanzenzelle, welches stabil in das pflanzliche Genom integriert wird (Willmitzer et al. 1982). Die darauf kodierten Gene verursachen Änderungen im Hormonhaushalt der Pflanzenzelle (verstärkte Auxin- und Cytokinin-Biosynthese), wodurch es zu erhöhter Zellteilung und den typischen morphologischen Veränderungen (s.o.) kommt. Zudem produzieren die transformierten Pflanzenzellen Opine, Aminosäurederivate, die von den Bakterien als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle genutzt werden (Petit et al. 1983). Die T-DNA wird von repetitiven Sequenzen flankiert (englisch „*border sequences*“) (Peralta & Ream 1985; Yadav et al. 1982). Dabei ist die rechte Seite („*right border*“) essentiell, da hier die für den Start der Prozessierung notwendigen Proteine binden. Die linke Seite („*left border*“) markiert das Ende, ist jedoch für die Mobilisierung des DNA-Abschnitts nicht zwingend notwendig (Details siehe 1.3.1.1).

Stämme vom Agropin-Typ, zu denen auch der für diese Arbeit verwendete zählt (Petit et al. 1983), besitzen zwei T-DNAs in unmittelbarer Nachbarschaft, von denen die rechte die Auxinsynthese-Gene trägt und die linke die *rol*- und Opinsynthesegene (White et al. 1985).

Die für die Transformation der Wirtszelle benötigten Gene liegen auf sehr großen Plasmiden (200 bis 250 kb, siehe Abbildung 11). Das Plasmid, das die Bildung des pathologischen Wurzelphänotyps verursacht („*root inducing*“, pRi) aus *A. rhizogenes* und das tumorinduzierende Plasmid (pTi) aus *A. tumefaciens* sind einander sehr ähnlich (Costantino et al. 1981). Beide enthalten neben der T-DNA Gene, die eine Weitergabe durch Konjugation ermöglichen, Gene für die Verwertung der Opine sowie für die Virulenz.

Detailliertere Informationen zu Aufbau und Funktionalität der Plasmide finden sich in Sinkar et al. (1987) und Suzuki et al. (2009).

Mehrere Arbeitsgruppen haben Reste von T-DNA in Pflanzengenomen gefunden, was darauf schließen lässt, dass eine Regeneration von Pflanzen aus *Agrobacterium*-transformiertem Gewebe sowie die Weitergabe der T-DNA über Samen (Tepfer 1984) auch in der Natur vorkommt. Näheres zur Erhaltung und Modifikation von T-DNA im pflanzlichen Genom bietet Kovacova et al. (2014). In der genannten Arbeit wird die These hergeleitet, dass die bakteriellen Sequenzen der Pflanze, vermittelt durch kleine RNAs, einen Schutz vor der Infektion durch *Agrobacterium*-Stämme bieten.

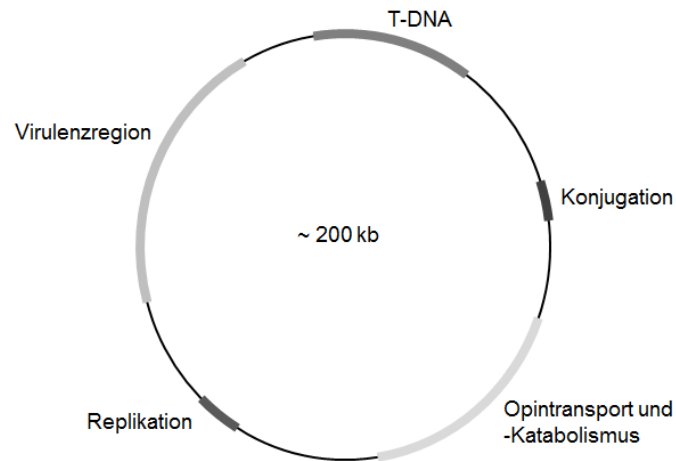


Abbildung 11: Schematische Übersicht eines Virulenzplasmids von *Agrobacterium*.

Die Abbildung zeigt eine Karte mit den typischen Regionen, die auf den Virulenzplasmiden von *Agrobacterium*-Stämmen zu finden sind. Die T-DNA wird auf die Wirtspflanze übertragen. Sie trägt die Onkogene und Gene für die Opinsynthese. Daneben finden sich auf dem Plasmid Virulenzgene, die für die Übertragung notwendige Proteine codieren, Gene für die Verwertung der Opine, sowie Gene, die für Replikation und Konjugation benötigt werden. Die Anordnung der Gene für Opinverwertung und Konjugation kann je nach Plasmidtyp variieren. Agropin-Typ-Plasmide tragen zwei T-DNAs in unmittelbarer Nachbarschaft.

1.3.1.1. Virulenzgene

Die Virulenzregion enthält die Operons *virB* bis *virE* und die regulatorischen Gene *virA* und *virG*, die für die Infektion und die DNA-Übertragung benötigt werden. Sequenz und Anordnung der Gene sind stark konserviert zwischen verschiedenen Ti- und Ri-Plasmiden (Schwartz & Steinbüchel 2009).

Die Transmembransensorkinase VirA erkennt kleine phenolische Moleküle, die von Pflanzen bei Verwundung abgegeben werden. Optimale Bedingungen hierfür sind ein schwach saurer pH von 5,0-5,5 und Temperaturen bis 28°C (Stachel & Zambryski 1986). VirA phosphoryliert daraufhin VirG, welches an die *vir* box bindet, einen Sequenzabschnitt vor dem Promotor der Virulenzregion (Roitsch et al. 1990), und die Expression der *vir*-Operons startet.

In Gegenwart von VirD1 schneidet VirD2 einen Strang des Plasmids an der rechten Seite der T-DNA und bindet kovalent an diese. Der Strang wird aus dem Plasmid gelöst und an der linken Seite ebenfalls geschnitten (Scheiffele et al. 1995). DNA-Polymerasen füllen mit dem verbleibenden Strang als Vorlage die Lücke wieder auf. Die proteingebundene T-DNA wird als T-Komplex bezeichnet. Das *virB*-Operon, das elf Gene enthält, kodiert die Proteine, die für den Transferkanal und den Transport in die Wirtszelle benötigt werden (Schröder & Lanka 2005). Die VirE2-Proteine dienen dem Schutz der einzelsträngigen T-DNA und deren Transport in den pflanzlichen Zellkern (Sundberg et al. 1996). Am

Einschleusen der T-DNA in den Zellkern und der Integration ins Genom sind auch pflanzliche Proteine beteiligt (Anand et al. 2007; Tzfira et al. 2001). Das *virE*-Operon fehlt auf Ri-Plasmiden (Moriguchi et al. 2001). In diesem Fall scheint das *GALLS*-Gen die Funktion von *virE2* zu übernehmen (Hodges et al. 2004).

1.3.1.2. Onkogene

Das verstärkte Wachstum und die veränderte Morphologie der Pflanzengewebe nach Infektion mit *Agrobacterium* werden durch Veränderungen im Hormonhaushalt verursacht. Verantwortlich dafür sind die auf der T-DNA lokalisierten Onkogene. Die Gene *iaaM* und *iaaH* (früher *tmsA* und *tmsB*) kodieren Enzyme, die unabhängig von der natürlichen Steuerung der Pflanze Indol-3-essigsäure (Auxin) aus Tryptophan synthetisieren. Zudem kodiert *ipt* (*tmr*) ein Enzym für die Bildung eines Cytokinins (Isopentenyladenosin-5-monophosphat) (Akiyoshi et al. 1984; Zambryski et al. 1989).

A. rhizogenes-Stämme tragen zusätzlich die Gene *rolA-D* (von „*root locus*“), die für die Bildung der Adventivwurzeln verantwortlich sind. Wahrscheinlich spielen dabei auch noch weitere Gene eine Rolle, z.B. *orf13* (Zambryski et al. 1989). Die genaue Funktion der Rol-Proteine ist noch nicht geklärt. Es wird vermutet, dass sie nicht direkt über die Bildung von Phytohormonen wirken, sondern durch Eingriffe in die Genregulation (Doran 2013). Denkbar ist z.B. eine Dephosphorylierung nukleärer Proteine durch RolB, da das Protein im Zellkern lokalisiert ist (Moriuchi et al. 2004) und Tyrosinphosphataseaktivität aufweist (Filippini et al. 1996).

Über die Beeinflussung von Wachstum und Morphologie hinaus scheinen die Rol-Proteine zahlreiche Prozesse in der Zelle zu beeinflussen. So wurde eine erhöhte Stresstoleranz u.a. gegenüber Salz, Temperatur und Licht nach Transformation mit *rol*-Genen beobachtet sowie eine antiapoptotische Wirkung von *rolB* (Übersicht in Doran 2013). Diese Effekte lassen sich teilweise mit der Senkung des Gehalts an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in den Zellen durch *rolB*- und *rolC*-Expression erklären (Bulgakov et al. 2008, 2012). Wahrscheinlich unterdrückt RolC die ROS-Produktion, während RolB den Abbau aktiviert, (Bulgakov et al. 2011). Zudem wurde eine Stimulation des Sekundärmetabolismus durch Expression von *rolB* und *rolC* beobachtet (Bulgakov 2008). In einigen Pflanzen, beispielsweise *Lithospermum erythrorhizon*, trat jedoch der gegenteilige Effekt auf (Bulgakov et al. 2005).

1.3.1.3. Opinsynthese und -verwertung

Opine sind Konjugate von α -Ketosäuren (z.B. Pyruvat) mit Aminosäuren. Pflanzen können sie weder bilden noch verwerten. Erst die Übertragung der Opinsynthesegene durch *Agrobacterium* ermöglicht die Opinsynthese durch die pflanzliche Wirtszelle. Die Bakterien besitzen die nötige genetische Ausstattung, um diese Konjugate als Kohlenstoff-, Stickstoff- und Energiequelle zu nutzen (Petit et al. 1983).

Ti- und Ri-Plasmide werden anhand der gebildeten Opine in verschiedene Typen eingeteilt. Bekannt sind Plasmide des Agropin-, Nopalins- und Octopins-Typs (häufig pTi) sowie des Mikimopins- und Cucumopins-Typs (häufig pRi) (Übersicht in Schwartz & Steinbüchel 2009). Die beteiligten Gene sind für die Nopalins- und Octopins-Typ-Plasmide gut untersucht: Die T-DNA von Nopalins-Typ-Plasmiden trägt die Gene *nos* und *acs*, die für die Enzyme Nopalinsynthese und Agropinopsynthese kodieren, welche die Synthese der typischen Opine katalysieren (Hattori et al. 2000). Auf Octopins-Typ-T-DNA finden sich *ocs* (Octopinsynthese), *ags* (Agropinsynthese) sowie *mas1* und *mas2* für die Synthese von Mannopinen (Zhu et al. 2000). Für die Konjugation genügt ein Enzym für jedes gebildete Opin, weshalb die Übertragung weniger Gene genügt, um die Synthese durch die Pflanzenzelle zu ermöglichen.

Die Verwertung der Opine scheint sich deutlich komplexer zu gestalten, denn es sind zahlreiche Gene daran beteiligt. Für Nopalins- und Agropins-Typ-Plasmide sind drei Operons mit jeweils mehreren Genen bekannt (*noc*, *nox*, *acc*), die Aufnahme und Katabolismus ermöglichen (Hattori et al. 2000). Beim Octopins-Typ sind mehr als 40 Gene beteiligt, die in mehreren Operons gruppiert sind (Zhu et al. 2000).

1.3.2. Haarwurzelkulturen in der Biotechnologie

Seit den frühen 90er Jahren wird an der biotechnologischen Nutzung von Haarwurzelkulturen geforscht. Die Kultivierung im großen Maßstab ist apparativ anspruchsvoller als bei den schon länger genutzten Zellkulturen (Kallus, Suspensionskultur), doch Haarwurzeln bieten im Vergleich dazu einige Vorteile: Sie sind genetisch stabiler (Aird et al. 1988) und bei sorgfältiger Selektion einheitlicher, da eine Wurzel aus einer transformierten Zelle entsteht (David et al. 1984). Man kann somit leichter Klone erhalten als bei der Induktion von Kallus. Hinzu kommt ein gewisser Differenzierungsgrad der Organkultur, was sich für die Bildung zahlreicher Metabolite, v.a. solcher, die auch in der Pflanze in der Wurzel synthetisiert werden, als vorteilhaft erwiesen hat. Haarwurzelkulturen erreichen oft

einen höheren Gehalt der gewünschten Substanzen als Zellkulturen (z.B. Tropanalkaloide, herzwirksame Glycoside) beziehungsweise synthetisieren Metabolite der Ausgangspflanze, die in der Zellkultur fehlen. Eine Übersicht dazu findet sich in Chandra & Chandra (2011). Die Biosynthese interessierender Stoffe kann durch Optimierung der Kultivierungsbedingungen und Elicitierung⁵ weiter gesteigert werden.

Neben pflanzlichen Sekundärstoffen können in Haarwurzelkulturen auch rekombinante Proteine hergestellt werden, beispielsweise Hepatitis B-Antigen (Kumar et al. 2006) oder Immunglobuline (Komarnytsky et al. 2006). Es ist relativ einfach, bei der Induktion von Haarwurzeln zusätzliche Gene, z.B. für ein gewünschtes Protein oder ein Enzym des Sekundärstoffwechsels, mit zu übertragen. Einerseits ist es möglich, mit einer Mischung zweier Bakterienstämme zu arbeiten (*A. rhizogenes* für die Wurzelbildung und ein *A. tumefaciens*-Laborstamm für das zusätzliche Transgen), da ein gewisser Anteil von Zellen durch mehrere Bakterien infiziert und transformiert wird. Effizienter ist es, zwei Plasmide im selben Bakterium einzusetzen (Petit et al. 1986). Dieser Versuch wurde mit einem *A. rhizogenes*-Klon durchgeführt, der zusätzlich ein Wildtyp-pTi enthielt. Im selben Jahr wurde gezeigt, dass auch der Einsatz binärer Vektoren in *A. rhizogenes* neben pRi möglich ist (Simpson et al. 1986). Inzwischen gibt es zahlreiche Beispiele für gentechnisch modifizierte Haarwurzelkulturen. Dazu zählen neben der oben genannten Produktion rekombinanter Proteine ebenso Versuche, durch Einbau oder Unterdrückung von Enzymen die Biosynthese von Sekundärstoffen zu beeinflussen. So war es z.B. möglich, die Bildung von Apigenin in *Saussurea involucrata* durch Überexpression der Chalkonisomerase unter Kontrolle eines 35S-Promotors auf das Zwölfwache zu erhöhen (Li et al. 2006). Die Beeinflussung von Enzymen des Terpenstoffwechsels führte zu Änderungen der Zusammensetzung des ätherischen Öls in Pfefferminze (Mahmoud & Croteau 2001; Mahmoud et al. 2004).

⁵ von lateinisch *elicere*, „entlocken, hervorbringen“; bezeichnet in der Bioverfahrenstechnik die Steigerung der Metabolitenbildung einer Zell- oder Gewebekultur durch Stress oder Signalstoffe

1.4. Zielstellung

Pyrrolizidinalkaloide sind aufgrund ihres mutagenen Potentials schon in sehr geringen Mengen als toxikologisch problematisch zu betrachten und daher bei der Produktion von Arzneipflanzenextrakten unerwünscht. Neben der Reinigung von Extrakten bietet sich gerade bei der biotechnologischen Produktion von Sekundärmetaboliten die Möglichkeit, gezielt in die Alkaloidbiosynthese einzugreifen. Diese Möglichkeit sollte hier am Beispiel von Beinwell untersucht werden.

Ziel der Arbeit war es, Haarwurzelkulturen von *Symphytum officinale* zu erzeugen, in denen die Biosynthese von Pyrrolizidinalkaloiden (PA) verringert oder ausgeschaltet ist. Hierbei dient *S. officinale* auch als Modell für andere PA-produzierende Pflanzen.

Als Angriffspunkt wurde Homospermidinsynthase (HSS) gewählt, das zu Beginn der Arbeit einzige bekannte Enzym der PA-Biosynthese und Startpunkt der Synthese der Necinbase (Abbildung 9). Es sollte gezeigt werden, ob eine verringerte Expression des für HSS kodierenden Gens zu einer Senkung des Alkaloidgehalts führt.

Zusätzlich sollte der Gehalt von Allantoin, dem wichtigsten wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoff, bestimmt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

Tabelle 1 enthält die verwendeten Geräte, hauptsächlich Mess- und Dokumentationsapparate. Für Geräte der Grundausstattung wie z. B. Zentrifugen und Sterilbänke wurde auf die Angabe des Typs verzichtet.

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Typ	Firma
Elektroporator	Easyject Optima	PeqLab
GC-MS	Autosampler CP-8400; GC 3900; MS Saturn 2100T (mit Ionenfalle) Software: Varian MS Workstation Version 6.9.3	Varian (Darmstadt, Deutschland) (jetzt Agilent)
Gefriertrocknung	Alpha 1-4	Christ
HPLC	Modulares System aus zwei Pumpen, Entgaser, Mischkammer, Autosampler (AS 1550); Detektor: MD-915 (Photodiodenarray) Software: JASCO ChromPass Version 1.8.6.1	Jasco
Nanodrop	ND-1000 Spektrophotometer	PeqLab
Quantitative PCR	qTower 2.2 Software: qPCRsoft 3.2	Analytik Jena
Rotationsverdampfer	Rotavapor R-200	Büchi
Thermocycler	Mastercycler ep gradient S	Eppendorf
UV-Gel- dokumentationssystem		Analytik Jena

2.1.2. Chemikalien

Chemikalien wurden, wenn nicht andere angegeben, von Roth, VWR, AppliChem oder Fisher Scientific bezogen. In der folgenden Tabelle sind nur Enzyme, Fertigmischungen und Chemikalien für die Analytik aufgeführt. Die verwendeten Medien und Zubereitungen sind bei den jeweiligen Versuchskomplexen aufgeführt.

Bestellt wurde, wenn nicht anders angegeben, bei deutschen Firmen oder deutschen Niederlassungen internationaler Firmen.

Tabelle 2: Bezugsquellen spezieller Chemikalien

Substanz / Produkt	Abkürzung Bemerkungen	/	Firma
Acetonitril	ACN; HPLC grade	gradient	Roth
Allantoin			Roth
Dream Taq DNA-Polymerase			ThermoFisher Scientific
Ethidiumbromid	1% in Wasser		Roth
Heliotrin			Sigma-Aldrich
Lithiumaluminiumhydrid	LiAlH ₄ 1 M	in	Sigma-Aldrich
N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide	Tetrahydrofuran MSTFA		Sigma-Aldrich
Murashige-Skoog-Medium mit Vitaminen	MS		Duchefa (Niederlande)
nukleasefreies Wasser	DEPC-Wasser		Roth
Phusion® High Fidelity DNA-Polymerase			New England Biolabs
Phytoagar			Duchefa (Niederlande)
Retronecin			Sigma-Aldrich
RNase A			Roth
RNAzol® RT			Sigma-Aldrich

2.1.3. Organismen

Nachfolgend sind die für die Versuche verwendeten Bakterienstämme und Pflanzenarten aufgeführt. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus unter Langtagbedingungen (16 h Licht pro Tag) kultiviert. Von März bis Oktober wurde einmal wöchentlich mit handelsüblichem Grünpflanzendünger (z.B. COMPO Grünpflanzen- und Palmendünger, NPK 7+3+6) gedüngt, weil Beinwell stickstoffreiche Böden bevorzugt.

E. coli wurde bei 37°C in LB-Medium angezogen, *A. rhizogenes* bei 26-28°C in YEB (Zusammensetzung siehe Tabelle 3). Details sind den jeweiligen Versuchsbeschreibungen zu entnehmen.

Bakterien:

Agrobacterium rhizogenes ATCC 15834 (erhalten vom Institut für Bioverfahrenstechnik, TU Dresden)

Escherichia coli XL1-Blue (Arbeitsgruppe Pflanzenphysiologie)

Escherichia coli DH5α (Arbeitsgruppe Pflanzenphysiologie)

Pflanzen:

Symphytum officinale

Symphytum x uplandicum „Bocking No. 14“

(bezogen von Rühlemann's Kräuter & Duftpflanzen, Auf dem Berg 2, 27367 Horstedt, Deutschland)

Tabelle 3: Medien zur Anzucht der verwendeten Organismen

Medium	Zusammensetzung	Organismus
LB	10 g/l Pepton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l Natriumchlorid ggf. 15 g/l Agar; pH 7	<i>Escherichia coli</i>
YEB	5 g/l Pepton 1 g/l Hefeextrakt 5 g/l Fleischextrakt 5 g/l Saccharose 493 mg/l Magnesiumsulfatheptahydrat	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>
MS-Medium	4.4 g/l MS-Salze 3% Saccharose ggf. 0,8% Phytoagar; pH 5.8	Haarwurzelkulturen, Kallus

Zur Lagerung von Bakterienstämmen wurden Dauerkulturen hergestellt. Dafür wurden 500 µl einer frischen Über-Nacht-Kultur (*E. coli*, ca. 16 h) oder 24-36 Stunden-Kultur (*A. rhizogenes*) mit 500 µl sterilem Glycerol (70 % V) gemischt. Die Kulturen wurden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Flüssigkulturen (Vorkultur, Über-Nacht-Kultur) wurden mittels Impföse aus einer gefrorenen Dauerkultur oder mit einer sterilen Pipettenspitze aus einer Kolonie auf Agarplatte angeimpft.

2.2. Erzeugung und Kultivierung der pflanzlichen Zell- und Organkulturen

Für die Erzeugung von Haarwurzelkulturen wurden stets junge Blätter bis maximal 20 cm Länge verwendet. Diese wurden kurz vor dem Versuch mit 2-3 cm Stiel geerntet und in Wasser mit Tensidzusatz (Tween 20 oder handelsübliche Flüssigseife) gewaschen. Die darauf folgenden Arbeiten wurden an einer Sterilbank durchgeführt.

Für die anschließende Oberflächensterilisation wurden die Blätter zunächst für 30 s in 70 % Ethanol mit zehn Tropfen Tween 20/400 ml getaucht. Darauf folgten fünf (*S. officinale*) bzw. vier (*S. x uplandicum*) Minuten in Calciumhypochloritlösung

(Tabelle 4). Anschließend wurde drei Mal mit sterilem Wasser gewaschen und die Blätter in sterilem Wasser aufbewahrt.

Von den sterilen Blättern wurden Stiel, Rand und bei der Sterilisation abgetötete Bereiche entfernt und Explantate mit ca. 1,5–2 cm Kantenlänge geschnitten. Große Blattadern wurden mehrfach mit dem Skalpell angeschnitten. Je nach Protokoll erfolgte dabei bereits die Inokulation, oder es wurde im Schüttelkolben mit bakterienhaltigem Medium co-kultiviert.

Der zur Inokulation vorgesehenen *Agrobacterium rhizogenes*-Stamm wurde aus einer Dauerkultur angeimpft und in YEB-Medium (Tabelle 3), ggf. mit Kanamycin, im Schüttelkolben bei 26°C über 24–36 h angezogen. Die Kultur wurde 15 min bei 6000xg zentrifugiert, das YEB-Medium abgegossen und in MS-Medium resuspendiert. Es folgte die Messung der Absorption bei 600 nm (OD_{600}), um anschließend die gewünschte Bakteriendichte einzustellen.

Da die Blätter beider Beinwell-Arten gut zu unterscheiden sind, wurde auch Material von beiden parallel im selben Versuch inokuliert. Hingegen wurde die Verwendung mehrerer Bakterienstämme am selben Tag vermieden, um Verwechslungen auszuschließen.

Tabelle 4: Lösungen und Medienzusätze für die Erzeugung von Haarwurzelkulturen

Substanz/Zubereitung	Zusammensetzung/Herstellung
Ascorbinsäurelösung	Stammlösung 100 mM in destilliertem Wasser, steril filtriert, Lagerung bei -20°C; unmittelbar vor Anwendung mit sterilem Wasser zu gewünschten Konzentration verdünnt
Calciumhypochlorit	Ca(OCl) ₂ , 6%ige wässrige Lösung eines 70%igen Granulats (entspricht 0,3 mol/l); frisch zubereitet und filtriert
Cefotaxim	10 Tropfen Tween 20 auf 400 ml 250 mg/l (Stammlösung 50 mg/ml in Wasser)
Hygromycin B	100 mg/l (Stammlösung 50 mg/ml in Wasser)

2.2.1. Co-Kultivierung (*S. officinale*)

Zur Erzeugung der *S. officinale*-Linien mit Wildtyp-Agrobakterien wurde eine Co-Kultivierungsmethode genutzt (modifiziert nach Pavlov et al. (2002)). Dabei wurden die sterilen, eingeschnittenen Blattexplantate in einem Erlenmeyerkolben mit 50 ml MS-Medium gesammelt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension vorbereitet (siehe vorangegangener Abschnitt), sodass die OD_{600} einer 5:1-Mischung im Zielbereich lag. Davon wurden 10 ml zu den Blattexplantaten

gegeben. Es wurde bei 100-120 rpm und 26°C im Schüttler inkubiert. Für *S. officinale* erwies sich eine OD₆₀₀ von 0,2 und eine Co-Kultivierungsdauer von 3 h als geeignet.

Anschließend wurden die Blattexplantate aus dem Flüssigmedium geholt und auf MS-Agar gelegt. Die Platten wurden im Klimaschrank bei 23°C und 16 h/d Licht inkubiert. Nach drei Tagen erfolgte das Umsetzen auf cefotaximhaltigen MS-Agar.

2.2.2. Direktinfektion (*S. officinale* und *S. x uplandicum*)

Da bei der Co-Kultivierung die Blattexplantate stark beschädigt wurden und viel Material abstarb wurde auch eine direkte Inokulation mittels eines in Bakteriensuspension getauchten Skalpells erprobt. Diese Methode erwies sich als geeigneter und wurde für die Erzeugung der Haarwurzeln von *Symphytum x uplandicum* mit Wildtyp-Bakterien sowie für alle Arbeiten mit gentechnisch modifizierten Agrobakterien genutzt. Es wurden Bakteriensuspensionen mit einer OD₆₀₀ von 0,2, 0,5, 1 und 1,5 verwendet. Für *S. officinale* eignen sich alle vier getesteten Verdünnungen. Von *S. x uplandicum* hingegen konnten nur mit einer OD₆₀₀ von 0,5 Haarwurzeln erzeugt werden. Für die Haarwurzelninduktion mit *S. x uplandicum* war es außerdem notwendig, die Explantate nach Inokulation mit Ascorbinsäurelösung zu behandeln, um ein Verbräunen und Absterben zu verhindern (Laskar et al. 2005). Dafür wurden je Petrischale 400 µl einer 10 mM wässrigen Ascorbinsäurelösung auf dem Medium verteilt. Bei den verwendeten Abmessungen (9 cm Durchmesser, ca. 20 ml Medium) wird bei vollständiger Diffusion eine Endkonzentration von ca. 200 µM im Medium erreicht.

2.2.3. Kultivierung und Selektion von Haarwurzelkulturen

Die inokulierten Blattexplantate wurden im Klimaschrank bei 23°C und 16 h/d Licht⁶ sowie 8 h Dunkelheit bei 18°C pro Tag inkubiert und nach drei Tagen auf cefotaximhaltigen MS-Agar (ohne Ascorbinsäure) umgesetzt. Danach erfolgte das Umsetzen auf frischen Agar nach Zustand der Explantate. Bei größeren Verbräunungen der Blätter wurden diese weggeschnitten und der lebende Teil auf frisches Medium übertragen. Das Absterben eines Explantats mit Verfärbung des Mediums erfordert rasches Umsetzen aller anderen Explantate derselben Petrischale, da diese sonst ebenfalls absterben. Zumeist waren wöchentliche

⁶ 30-45 µmol*m⁻²*s⁻¹, gemessen mit einem WALZ ULM-500 Lichtmeßgerät

Maßnahmen nötig; wenn nicht, wurde spätestens nach drei Wochen auf frisches MS-Medium umgesetzt. Wenn sich Wurzeln oder wurzelähnliche Strukturen bildeten, wurden diese abgeschnitten und getrennt vom Blatt im Dunkeln bei 26°C weiterkultiviert. Jede Wurzel stellt potentiell eine unabhängige Linie dar, wobei oft schwer ist, zwischen nah beieinander entspringenden Wurzeln und Verzweigungen zu unterscheiden. Deshalb wurde dokumentiert, welche Haarwurzelkandidaten von welchem Blattexplantat stammten, um später nur sicher verschiedene Linien, d. h. solche, die von verschiedenen Explantaten stammen, zu behalten. Das Wachstum wurde wöchentlich beobachtet. Explantate und (Haar-)Wurzeln wurden die ersten 2-3 Monate auf cefotaximhaltigem Medium kultiviert, um die Agrobakterien abzutöten, danach auf MS-Agar ohne Cefotaxim. Von Wurzellinien, die auf hormonfreiem MS-Medium wuchsen, wurden Proben genommen, genomische DNA isoliert und mittels PCR auf Bakterienfreiheit und das Vorhandensein der T-DNA überprüft (siehe 2.4.3.1). Bei Hinweisen auf Bakterienkontamination wurde die entsprechende Linie erneut 2-3 Zyklen auf cefotaximhaltigem Medium kultiviert und die Untersuchung wiederholt.

Für Linien, die mit gentechnisch veränderten Agrobakterien erzeugt wurden (Abschnitt 2.3.3), erfolgte zunächst ein Selektionsschritt auf MS-Medium mit 100 mg/l Hygromycin B für zwei Wochen. Nur bei Kandidaten, die auf dem Selektionsmedium wuchsen, wurde die Untersuchung der DNA durchgeführt. Zusätzlich zu den bakteriellen Genen wurde auch das Vorhandensein des Konstrukts überprüft (2.4.3.1).

Die zur Selektion verwendete Hygromycinkonzentration von 100 mg/l wurde vor Durchführung der Arbeiten mit transgenen Agrobakterien an Wildtyp-Haarwurzeln ermittelt. Dafür wurden Haarwurzeln auf MS-Medium mit verschiedenen Hygromycinkonzentrationen (0, 20, 50, 100, 150 und 200 mg/l, später 0, 20, 50, 70, 80 mg/l) gesetzt und drei Wochen lang beobachtet. Nach drei Wochen wurden Wurzelspitzen von den Hygromycin-Platten auf hygromycinfreies MS-Medium umgesetzt und erneut drei Wochen beobachtet. Es wurden drei verschiedene Linien getestet. Die niedrigste getestete Konzentration, bei der Wildtyp-Haarwurzeln sicher abgetötet wurden, war 100 mg/l (Abbildung 12). Bei den Versuchen zeigte sich, daß eine Einwirkzeit von zwei Wochen für die Selektion ausreichend ist.

Haarwurzelkandidaten und bestätigte Linien wurden stets im Dunkeln bei 26°C kultiviert. Dabei wurde alle drei Wochen auf frisches MS-Medium umgesetzt. Gelegentlich traten bakterielle Kontaminationen auf. Diese ließen sich leicht durch

Ausplattieren von 40 µl Ampicillinlösung (100 mg/ml) auf dem MS-Agar vor Umsetzen frischer Wurzelspitzen entfernen.

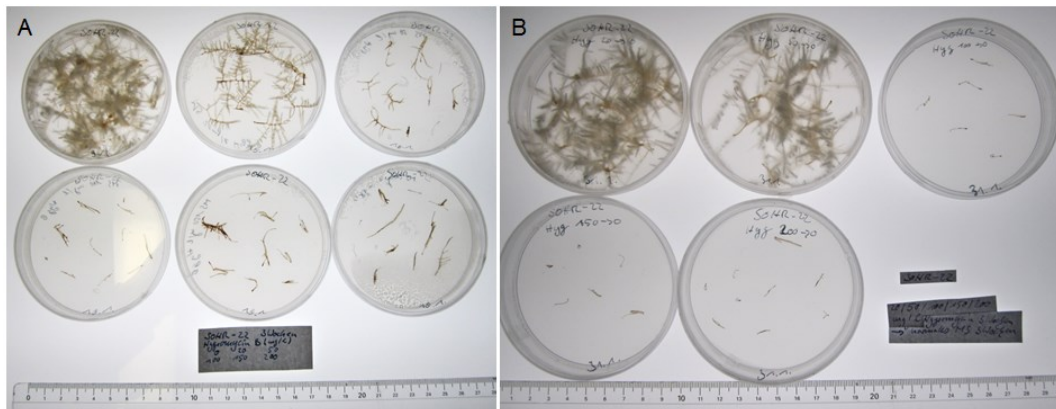


Abbildung 12: Wirkung verschiedener Konzentrationen von Hygromycin B auf Wildtyp-Haarwurzeln. Teil A zeigt die Wildtyp-Haarwurzelnlinie SOHR-22 nach drei Wochen auf MS-Medium mit (von links nach rechts und von oben nach unten) 0, 20, 50, 100, 150 und 200 mg/l Hygromycin B. Während bei 0 mg/l normales Wachstum zu sehen ist und bei den anderen Konzentrationen verringertes Wachstum zu beobachten war, konnte bei drei höheren Konzentrationen kein Wachstum festgestellt werden. Teil B zeigt die Haarwurzeln drei Wochen nach Umsetzen von den hygromycinhaltigen auf hygromycinfreie MS-Platten (ohne 0 mg/l). Nach Passage auf 20 und 50 mg/l sind die Haarwurzeln weitergewachsen, nach höheren Konzentrationen hingegen nicht.

2.2.4. Kallus

An einem mit *A. rhizogenes* inokulierten Explantat von *S. officinale* bildete sich eine größere Menge weicher Kallus. Dieser wurde abgenommen und auf hormonfreiem MS-Medium im Klimaschrank weiterkultiviert (16 h/d Licht bei 23°C, 8 h Dunkelheit bei 18°C). Nach hinreichender Vermehrung wurde ein Teil des Kallus in den Brutschrank (26°C, Dunkelheit) überführt, sodass aus demselben Ursprungsmaterial eine im Hellen und eine im Dunklen kultivierte „Linie“ erhalten wurden.

2.2.5. Flüssigkultur und Probengewinnung

Kallusproben für die Analytik wurden nach drei Wochen Kultivierung von Agarplatten gewonnen und gefriergetrocknet. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Die Anzucht von Haarwurzeln zur Probengewinnung für die Expressionsanalyse und die Sekundärstoffbestimmung erfolgte in Flüssigkultur. Es wurden je drei Mal in aufeinanderfolgenden Kultivierungszyklen alle vorhandenen Linien angezogen, um für jede Linie drei Replikate zu gewinnen (Probensätze A, B und C). Dafür wurden je 150 ml MS-Medium in sterilen Rechteckbechern aus Polypropylen

(108x82x96 mm (500 g), Firma Wächter & Co.) vorgelegt und mit Kulturmateriel von drei Wochen alten Platten beimpft. Dafür wurden in der Regel pro Becher alle jungen, hellen Wurzeln einer Petrischale verwendet. Beim dritten Ansatz (C) wurde für die schlecht wachsenden Linien mehr Material angezogen und in den Becher überführt. Die Kultivierung erfolgte für 14 d bei 26°C und 100 rpm im Dunkeln. Bei der Ernte wurden je drei Proben für die RNA-Präparation gewonnen (rund 90 mg, Lagerung bei -80°C). Das restliche Material wurde gefriergetrocknet, gemörsert, bei -20°C gelagert und für die Sekundärstoffanalytik verwendet.

Pflanzenmaterial von *S. officinale* und *S. x uplandicum* wurde an zwei Zeitpunkten (10. März und 22. Juli 2016) im Gewächshaus geerntet. Je Art und Organ wurde Material von zwei bis drei Pflanzen zu einer Mischprobe zusammengefaßt. Es wurde unterschieden in junge Blätter (Länge der Blattspreite <5 cm), mittlere Blätter (>5 cm, *S. officinale* <15 cm, *S. x uplandicum* <10 cm) und ausgewachsene Blätter (>15 bzw. >10 cm). Wurzeln wurden ebenfalls in drei Gruppen unterschieden: über ein Jahr alte Wurzeln mit dunkelbrauner Rhizodermis und einem Durchmesser von mehr als einem Zentimeter, jüngere Wurzeln mit hellbrauner Rhizodermis und maximal 0,5 cm Durchmesser, sowie Feinwurzeln. Die Wurzeln wurden mit Wasser und Pinsel von Erde befreit. Alle Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, gefriergetrocknet und gemörsert. Die Lagerung des Pflanzenpulvers bis zur Verwendung erfolgte bei -20°C.

2.2.6. Wachstumsuntersuchungen

Zum Vergleich des Wachstums verschiedener Wurzellinien wurden eine Woche nach dem regulären Umsetzen Wurzelspitzen von mindestens 3 mm Länge abgenommen, auf MS-Medium gebracht und zu den üblichen Bedingungen (2.2.3 unten) inkubiert. Pro Linie wurden zwei Platten vorbereitet; es wurden in der Regel zehn Wurzelspitzen auf eine Platte gebracht, jedoch war bei einigen Linien zu wenig Material vorhanden. Die Position der Wurzelspitzen wurde markiert, ebenso wie Startpunkt und Richtung der Messung, sodaß sich jeweils die vier Meßwerte einer Wurzelspitze einander zuordnen ließen. Nach 2, 5, 8 und 12 Tagen wurde der Längenzuwachs seit Versuchsbeginn gemessen und festgehalten, wieviele Wurzeln Verzweigungen gebildet hatten. Starb die Spitze ab oder wuchs deutlich langsamer als die Seitenwurzeln, wurde die längste Seitenwurzel gemessen. Dieser Versuch wurde drei Mal durchgeführt.

Um den Aufwand für die Kulturerhaltung zu reduzieren wurde erprobt, ob sich das Wachstum der Haarwurzelkulturen durch Lagerung bei niedrigen Temperaturen verlangsamen lässt, ohne dass diese absterben. Dafür wurden in einem ersten Versuch von einer Stichprobe, später von allen vorhandenen Linien jeweils drei frische Platten vorbereitet. Nach drei Tagen bei 26°C wurden diese für drei, vier beziehungsweise sechs Monate bei 8°C gelagert. Anschließend wurden die Kulturen für 3-5 d bei 26°C aufgestellt und dokumentiert, ob sie gewachsen waren. Danach wurden die Wurzelspitzen auf frisches Medium umgesetzt und bei 26°C inkubiert. Nach einer Woche wurde erneut überprüft, ob die Kulturen gewachsen waren.

2.3. Erzeugung der gentechnisch modifizierten *Agrobacterium*-Stämme

2.3.1. Präparation elektrokompeter Zellen

Aus einer Dauerkultur (siehe 2.1.3) von *E. coli* wurden 20 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm kultiviert. Aus dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur mit 250 ml LB-Medium 1:100 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 bis 0,8 kultiviert. Anschließend wurde die Kultur auf Eis gekühlt, ebenso alle benötigten Gefäße und Flüssigkeiten.

Die Zellen wurden in sterilen Zentrifugenbechern bei 2000xg und 4°C für 10 min sedimentiert. Das Medium wurde verworfen und die Zellen in 250 ml sterilem bidestilliertem Wasser resuspendiert. Es folgten vier weitere Waschschrte, bei denen das Volumen an Wasser jeweils halbiert und der Ansatz schrittweise in kleinere Gefäße überführt wurde. Anschließend wurden die Zellen einmal in 30-50 ml sterilem 10 %igem Glycerol gewaschen und erneut sedimentiert. Zuletzt wurde in 1 ml 10 % Glycerol resuspendiert und zu je 60 µl aliquotiert. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die Präparation elektrokompeter *A. rhizogenes* wurde analog durchgeführt. Allerdings benötigt die Vorkultur 24 h bei 26°C in YEB-Medium. Die Hauptkultur wurde 1:50 am Morgen vor dem Präparationstag angeimpft. Die Zellen sedimentieren schlechter als *E. coli*, sodass bei 5000xg zentrifugiert wurde, bei 2000xg sind die Verluste beim Waschen zu groß.

2.3.2. Transformation mittels Elektroporation

Zur Transformation wurden elektrokompente Zellen (60 µl) auf Eis aufgetaut und eine Elektroporationsküvette (2 mm) und die DNA-Lösung vorgekühlt. Zu den Zellen wurden 2 µl Ligationsansatz oder Plasmid (10-50 ng) zugegeben, gemischt und 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in die Elektroporationsküvette überführt, diese abgetrocknet und im Elektroporator platziert. Der Impuls erfolgte mit den vorgegebenen Einstellungen für *E. coli* und eine 2 mm Küvette (2500 V, 15 µF, 335 R). Diese Einstellungen eignen sich auch für *A. rhizogenes*. Anschließend wurde sofort 1 ml SOC-Medium zugegeben und die Zellen in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Regeneration der Zellen erfolgte unter leichtem Schütteln (Rotator, 25 rpm) für 45-60 min bei 37°C (*E. coli*) bzw. 3 h bei 26-28°C (*A. rhizogenes*). Anschließend wurde auf Selektionsmedium (Tabelle 5) ausplattiert (50, 100 und 200 µl und die Restmenge). *E. coli* wuchs über Nacht bei 37°C, *A. rhizogenes* 20-24 h bei 26°C (bis sich Kolonien zeigten). Dann wurden Kolonien zur weiteren Untersuchung ausgewählt, neu ausgestrichen und mittels PCR untersucht. Die neu ausgestrichenen Platten wurden bis zum Folgetag bei den genannten Bedingungen im Brutschrank inkubiert. Die Lagerung der Platten erfolgte bei 4-8°C.

Zusammensetzung des SOC-Mediums:

2% Pepton

0,5% Hefeextrakt

10 mM Natriumchlorid

2,5 mM Kaliumchlorid

10 mM Magnesiumchlorid

10 mM Magnesiumsulfat

auf pH 7 einstellen; nach Autoklavieren 20 mM Glucose zugeben (Stammlösung 2 M, sterilfiltriert); Das Medium wurde in 1- und 2 ml-Aliquots bei -20°C eingefroren und bei Bedarf aufgetaut.

Tabelle 5: Medienzusätze für die Transformation. Selektionsmedien waren, je nach Bakterium, LB- oder YEB-Agar mit Zusatz von IPTG, X-Gal und Ampicillin für Klonierungen in pGEM-T oder Kanamycin bei Transformation mit den verwendeten Gateway-Vektoren.

Substanz	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml (Wasser, sterilfiltriert)	100 µg/ml
Kanamycin	10 mg/ml (Wasser, sterilfiltriert)	50 µg/ml
IPTG	0,1 M (Wasser, sterilfiltriert)	0,5 mM
X-Gal	40 mg/ml in Dimethylformamid (DMF)	80 µg/ml

2.3.3. Generierung der künstlichen microRNA-Konstrukte

2.3.3.1. Grundlagen künstliche microRNA

MicroRNAs (miRNA) sind kurze RNAs, die eine wichtige Rolle in der Genregulation mehrzelliger Lebewesen spielen, insbesondere bei der Entwicklung und Differenzierung. In Pflanzen sind sie meist ~21 Nukleotide lang. Sie gehen aus langen Vorläufern, den pri-miRNAs, hervor, die ihrerseits auf der DNA codiert sind. In Pflanzen sind diese Vorläufer insgesamt länger und in ihrer Länge variabler als in Tieren (Reinhart et al. 2002). Sie falten sich zu langen Haarnadelstrukturen mit komplexer Sekundärstruktur durch kleine Bereiche, in denen die Basen nicht zusammenpassen. Daraus wird noch im Zellkern spezifisch der miRNA/miRNA*-Duplex herausgeschnitten (Kurihara & Watanabe 2004; Papp et al. 2003). Danach erfolgt der Transport in das Cytoplasma (Bollman 2003) und der spezifische Einbau des miRNA-Strangs in einen Proteinkomplex („RNA induced silencing complex“, RISC) (Hammond et al. 2000; Hutvágner & Zamore 2002; Schwarz et al. 2003). Geleitet durch die miRNA bindet dieser Komplex an die Ziel-mRNA und schneidet diese zwischen den Nukleotiden, die komplementär zu den Basen 10 und 11 der miRNA sind. Translationshemmung, wie sie häufig in tierischen Zellen zu beobachten ist, scheint in Pflanzen seltener zu sein. Detaillierte Informationen zu miRNA in Tieren und Pflanzen finden sich z.B. in (Bartel 2004), speziell für Pflanzen in (Chen 2005).

Dieses endogene Regulationssystem lässt sich auch für das gezielte Stilllegen oder Herunterregulieren von Genen nutzen (Ossowski et al. 2008; Schwab et al. 2006). Dabei wird eine zum Zielgen komplementäre 21 Nukleotide lange Sequenz ausgewählt und gemeinsam mit der korrespondierenden Sequenz in ein natürliches miRNA-Gen eingebracht, wobei die natürliche miRNA und miRNA* ersetzt werden. Dieses Konstrukt wird in den gewünschten Organismus eingebracht und kann dort abgelesen und prozessiert werden. Ergebnis ist die Bildung einer künstlichen miRNA („artificial microRNA“, amiRNA), die den Abbau der Ziel-mRNA induziert (siehe Abbildung 13).

Diese Methode produziert ein kurzes, definiertes RNA-Stück und vermeidet das Fortschreiben der kurzen RNAs durch RNA-abhängige RNA-Polymerasen. Somit ist sie etwas präziser als die Arbeit mit kurzen Haarnadelkonstrukten⁷ (Ossowski

⁷ Für künstliche kurze Haarnadelkonstrukte („short hairpin“) wird ein geeigneter Abschnitt des Zielgens ausgewählt und nach einer Verlängerungssequenz revers komplementär wiederholt. Daraus faltet sich eine perfekte Haarnadel, die zu kleinen Einzelstrang-RNA-Stücken prozessiert wird. Allerdings lässt sich hier nicht vorhersagen, wo genau geschnitten wird. In Pflanzen können die RNA-Stückchen unter Umständen als Primer für RNA-abhängige RNA-Polymerasen dienen und so doppelsträngige RNA von Genabschnitten

et al. 2008). Das ist in diesem Projekt von besonderer Bedeutung, da das Gen des Primärstoffwechselenzyms DHS sehr starke Sequenzhomologie zum Zielgen *HSS* aufweist und ein Ausschalten beider Funktionen vermieden werden sollte. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit mit amiRNAs gearbeitet.

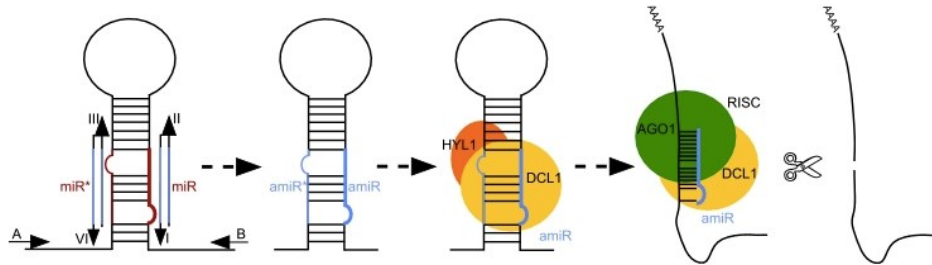


Abbildung 13: Genregulation mit künstlicher microRNA. Dargestellt ist ein Fließschema vom Austausch der miRNA/miRNA*-Sequenzen im Vorläufergen über die Prozessierung *in vivo*, den Einbau in RISC und schlussendlich den Abbau der Ziel-mRNA. Der Austausch der miR/miR*-Sequenzen gegen die gewünschten künstlichen Sequenzen erfolgt über PCR mit den Oligonukleotiden A, B und I-IV. DCL1 – „dicer-like1“, schneidet die pre-miRNA; HYL1 – „hyponastic leaves1“, Bindeprotein für doppelsträngige RNA; AGO1 – Argonaut1, Protein, das für den gezielten RNA-Abbau verantwortlich ist; Quelle: <http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>; Abruf 10.10.2017

2.3.3.2. Durchführung

Mit dem Web MicroRNA Designer (WMD3)⁸ wurde eine Liste möglicher amiRNAs für Beinwell-*HSS*-mRNA erzeugt. Als Zielsequenz wurde die cDNA-Sequenz von *HSS* (GenBank-Nummer AJ704851.1) eingegeben. Da zum Zeitpunkt der Durchführung (22.11.2011) keine Genomsequenz einer Boraginaceae verfügbar war, wurde das *Arabidopsis*-Genom als Hintergrund verwendet. Aus der resultierenden Liste wurden nach den für das Online-Werkzeug beschriebenen Kriterien Sequenzen ausgewählt und mittels NCBI Blast auf Spezifität getestet. Dabei wurde auf Grundlage der miRNA-Sequenzen eine Suche gegen die in der Datenbank enthaltenen Pflanzensequenzen durchgeführt um zu überprüfen, zu welchen Genen neben *Symphytum officinale HSS* noch Ähnlichkeit besteht. *HSS*-Sequenzen anderer Pflanzen waren akzeptable Treffer. Sequenzübereinstimmung mit *DHS* war unerwünscht. Insbesondere sollten die miRNAs keine Identität mit der *DHS*-Sequenz von *Symphytum officinale* (GenBank-Nummer AJ704852.1) aufweisen. Mindestens die Basen 10 und 11 (siehe 2.3.3.1) sowie vier weitere sollten sich unterscheiden.

bilden, die zu anderen Genen homolog sind. Das erhöht die Wahrscheinlichkeit von Kreuzreaktionen.

⁸ <http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>; durchgeführt am 22.11.2011

Bei zwei Sequenzen (im Namen mit „a“ gekennzeichnet) wurde, den Empfehlungen von WMD3 folgend, jeweils eine Base am 3'-Ende ausgetauscht, um die relative 5'-Instabilität sicherzustellen und die Entstehung weiterer kleiner RNAs durch unerwünschtes Fortschreiben *in vivo* zu vermeiden (Ossowski et al. 2008). Die verwendeten Sequenzen sind in Tabelle 6 aufgeführt, Abbildung 14 zeigt die Bindestellen an der *HSS*-mRNA.

Tabelle 6: Verwendete künstliche Micro-RNAs

Name	Sequenz miRNA	Sequenz miRNA*
miRhss1a	TTATTTAAATGTCTCACGCC G	CGACGTGAGACATATAAATA T
miRhss2	TCAAATGTGATGCTTAGGCA G	CTACCTAAGCATCTCATTGT
miRhss4a	TATTGTCCATAGCACTTACG T	ACATAAGTGCTATCGACAATT

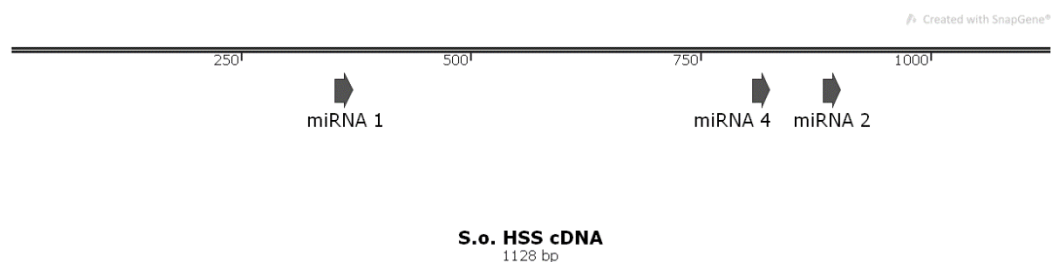


Abbildung 14: cDNA von *HSS* aus *Symphytum officinale* mit den Bindestellen der künstlichen miRNAs

Ebenfalls mit WMD3 wurden die benötigten Oligonukleotide zur Präparation der Pre-miRNAs unter Verwendung des Plasmids pRS300⁹ berechnet. Dieses Plasmid enthält die Sequenz der pre-miRNA MIR319a aus *Arabidopsis*, die als Vorlage verwendet wird, um durch Austausch der miRNA- und miRNA*-Sequenz eine künstliche pre-miRNA zu präparieren. Dies geschah mittels Overlap-PCR nach dem in (Schwab 2007; Schwab et al. 2006) publizierten Protokoll. Anschließend wurden die Produkte ebenfalls mittels PCR mit Signalsequenzen („att-sites“) für die GatewayTM-Klonierung (Invitrogen) versehen. Um eine geringe Fehlerrate zu erzielen wurde die Phusion® DNA-Polymerase verwendet.

Die fertigen Konstrukte wurden nach Herstellerprotokoll in pDONR221 (Invitrogen) rekombiniert und mittels Elektroporation in *E. coli* transformiert. Für Konstrukt 1a wurde XL1-Blue verwendet, für die anderen DH5α. Aus Einzelkolonien der resultierenden Klone wurde das Entry-Plasmid isoliert und sequenziert (Eurofins

⁹ Bezogen von Detlef Weigel, Max Planck Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen über Addgene, USA

Genomics). Anhand der Sequenzierungsergebnisse wurden Fehler aus den PCR-Schritten ausgeschlossen. Es folgte die Rekombination in den Zielvektor pMDC32 (Curtis & Grossniklaus 2003) und erneut die Vermehrung in *E. coli*. In diesem Plasmid liegt die Rekombinationsstelle zwischen einem 2x35S-Promotor und einem Nos-Terminator. Das resultierende Zielplasmid (pALmiRhss1a/2/4a, Abbildung 16) wurde aus der Kultur gereinigt und mittels PCR (Insert- und Hygromycin-Primer, Tabelle 8) bestätigt. Die Plasmide wurden durch Elektroporation in *Agrobacterium rhizogenes* übertragen und die transformierten Stämme zur Induktion von Haarwurzeln genutzt (siehe 2.2).

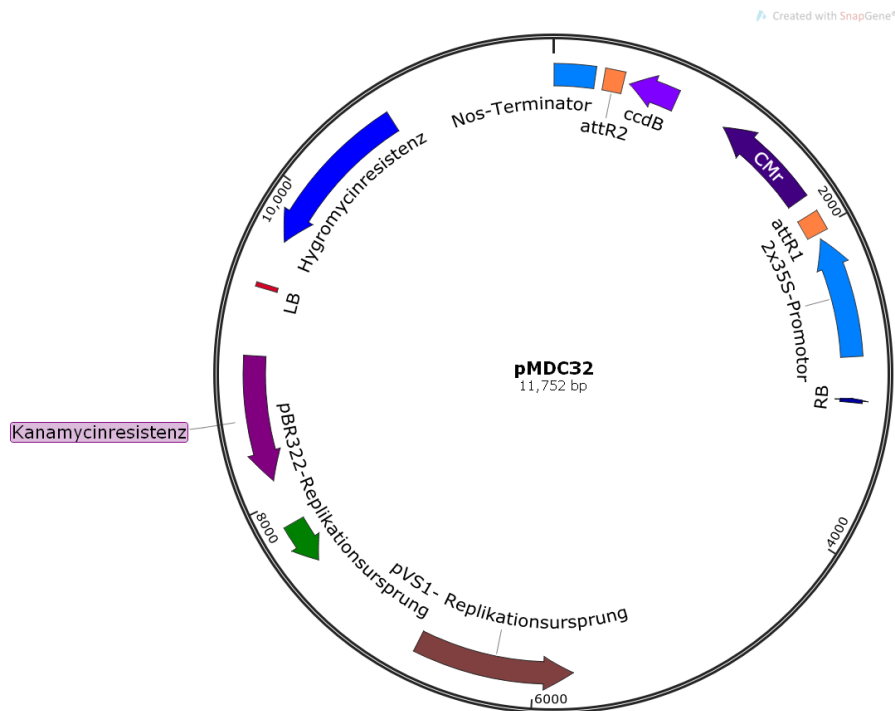


Abbildung 15: Plasmidkarte von pMDC 32. Darstellung des verwendeten Zielplasmids; LB - left border“, linke Grenze der T-DNA; RB - „right border“, rechte Grenze der T-DNA Zwischen den Sequenzen befinden sich die Integrationsstelle, umgeben vom 2x35S-Promotor und Nos-Terminator, sowie das Hygromycin-B-Phosphotransferasegen als Selektionsmarker.

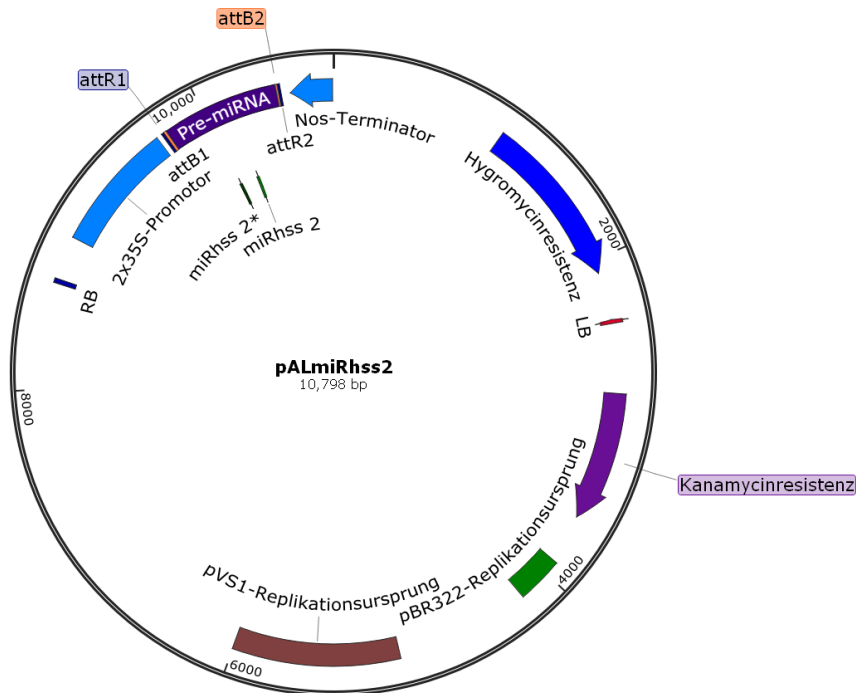


Abbildung 16: Plasmidkarte von pALmiRhss2. Die Abbildung zeigt eine Karte des zur Erzeugung transformierter Haarwurzeln verwendeten Plasmids pALmiRhss2. Zwischen Promotor und Terminator sind die Rekombinationsstellen dargestellt (attB und attR). Dazwischen liegt das miRNA-Vorläufergen, hier mit miRhss2 und deren Gegenstück miRhss2*.

Um ein Kontrollplasmid ohne Konstrukt (pMDC32-0) zu erhalten wurde mittels Restriktionsverdau der Sequenzabschnitt zwischen den att-Signalsequenzen aus pMDC32 entfernt. Dafür wurden 2 µg Plasmid mit 10 U XbaI (Fisher Scientific) zwei Stunden lang verdaut. Anschließend wurde über Gelelektrophorese gereinigt und 50 ng religiert (T4-Ligase, Fisher Scientific, nach Herstellerprotokoll). Die Inkubation erfolgte eine Stunde bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht im Kühlschrank bei 4-8°C. Es folgten die Hitzeinaktivierung der Ligase und die Transformation in XL1-Blue. Das Plasmid wurde gereinigt und der Abschnitt zwischen Promotor und Terminator mittels PCR vervielfältigt und sequenziert (seq-pMDC32-Primer, Tabelle 8).

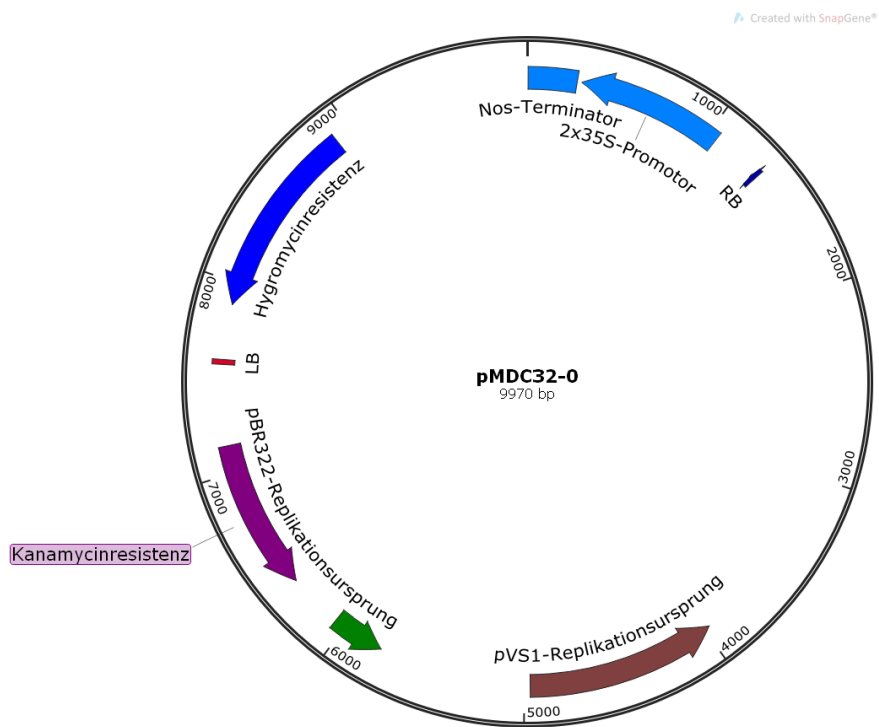


Abbildung 17: Plasmidkarte von pMDC32-0. Auf dieser Karte von pMDC32-0 ist erkennbar, daß die Sequenzen zwischen Promotor und Terminator fehlen.

2.4. Qualitative und quantitative Untersuchungen an Nukleinsäuren

Tabelle 7 zeigt die Zusammensetzung der im Labor hergestellten Puffer und (Färbe-)Lösungen für molekularbiologische Arbeiten. Kommerziell erhältliche Produkte werden im Text genannt.

Tabelle 7: Puffer und Lösungen für die molekularbiologischen Arbeiten

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
2xCTAB	2% CTAB 100 mM Tris/HCl (pH 8) 20 mM EDTA 1,4 M Natriumchlorid 2% PVP (molare Masse 360 000)
Ethidiumbromid	0,8-1 mg Ethidiumbromid pro Liter destilliertes Wasser
Natriumacetatlösung	3 M in destilliertem Wasser, pH 5,2, autoklaviert
RNase A-Lösung	10 mg/ml in Wasser
5x RNA-Ladepuffer	8 mM Na ₂ EDTA 72 ml/l Formaldehyd (37%) 20% Glycerol 30% Formamid 5,5 mM Natriumacetat 80 mM MOPS 0,5 mM Cresolrot pH6

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
TAE (50x Stammlösung)	2 M Tris Base 50 mM Natrium-EDTA 5,7% Essigsäure in destilliertem Wasser pH 8,5; autoklavieren; zur Anwendung 1:50 mit Wasser verdünnen

2.4.1. Nukleinsäurepräparation

2.4.1.1. Genomische DNA aus *Symphytum*

Zur Isolierung von genomischer DNA aus Beinwellpflanzen, -haarwurzelkulturen und -kallus wurde ein nach Doyle & Doyle (1987) modifiziertes Protokoll genutzt. Die Arbeiten erfolgten, wenn nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur. Zunächst wurden je Probe 700 µl 2xCTAB-Puffer in Eppendorfgläsern vorgelegt und im Thermomixer auf 65°C erwärmt. Das Pflanzenmaterial wurde mit flüssigem Stickstoff gemörst und eine Spatelspitze (ca. 200-300 mg) in den erwärmten Puffer gegeben. Nach Zugabe von 7 µl β-Mercaptoethanol wurde kräftig gemischt und die Proben bei 65°C unter Schütteln (350 rpm) für 45 min inkubiert. Danach wurde zentrifugiert (16.000xg, 10 min) und der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

Zum Entfernen der Proteine wurde mit 700 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol – Gemisch (25/24/1) ausgeschüttelt und zentrifugiert (16.000xg, 10 min). Der Überstand wurde erneut mit 700 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) ausgeschüttelt. Es wurde wieder zentrifugiert und die obere Phase in ein frisches Gefäß überführt.

Um mitextrahierte RNA zu entfernen wurden 3 µl RNase A-Lösung zugegeben und die Proben 15-30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde erneut mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt.

Aus dem Überstand wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen Natriumacetatlösung und 0,8-1 Volumen Isopropanol die DNA gefällt. Dieser Schritt erfolgte in der Regel über Nacht bei -20°C. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation sedimentiert (16.000xg, 4°C, 20 min), das Pellet zwei Mal mit 70% Ethanol gewaschen und kurz getrocknet. Es wurde mit 20 µl Wasser (bidestilliert, autoklaviert) zurückgelöst. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20°C.

2.4.1.1. Plasmidpräparation

Für die Präparation von Plasmiden wurden 2 ml Übernachtskultur von *E. coli* (LB-Medium, 37°C, 180 rpm, ca. 16 h; siehe 2.1.3) mit einem Kitsystem aufgearbeitet. Eingesetzt wurden Invisorb® Spin Plasmid Mini Two (strattec molecular) und NucleoSpin® Plasmid EasyPure (Machery-Nagel) nach Anleitung des Herstellers. Trotz seiner Größe ist in den resultierenden Plasmidpräparationen auch pRi (siehe 1.3.1) aus *Agrobacterium rhizogenes* nachweisbar. Aufgrund des langsameren Wachstums sind Agrobakterien 24-36 h anzuziehen.

2.4.1.2. Reinigung von PCR-Produkten

Zur Reinigung von PCR-Produkten für Sequenzierung oder Klonierungsarbeiten wurde der fertige PCR-Ansatz (siehe 2.4.3.1) über ein Agarosegel getrennt (2.4.2) und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die gewünschte Bande wurde unter UV-Licht ausgeschnitten, das Gelstück gewogen und eingefroren. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung mit dem Invisorb® Spin DNA Extraction Kit (strattec molecular) oder dem Fast Gene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Genetics).

2.4.1.3. RNA aus *Symphytum* Haarwurzelkulturen

Arbeiten mit RNA wurden, soweit möglich, auf Eis ausgeführt. Mörtel und Pistille wurden vor Gebrauch mit 1% SDS-Lösung und anschließend mit Ethanol gespült, um RNasen zu inaktivieren.

Zur Präparation von RNA wurden rund 90 mg frisches oder gefrorenes Kulturmateriel mit flüssigem Stickstoff gemörtelt und mit 1 ml RNAzol® (Sigma-Aldrich) homogenisiert. Die weitere Aufbereitung erfolgte mit dem Direct-zol RNA MiniPrep Kit von Zymo Research nach Herstellerangaben. Es wurde mit 40 µl eluiert. Da der DNase-Verdau auf der Säule nur unzureichend erfolgte, wurde nach der Präparation ein separater DNase I-Verdau durchgeführt (Chemikalien von Fisher Scientific). Dazu wurden 10 µg RNA mit Reaktionspuffer, 3 U DNase I und 40 U Ribolock versetzt und mit nukleasefreiem Wasser auf 40 µl aufgefüllt. Anschließend wurde 30 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 50 mM Na₂EDTA und Erhitzen auf 65°C für 10 min gestoppt. Anschließend wurde erneut mittels RNA Clean & Concentrator™-25 Kit (Zymo Research) gereinigt. Das Elutionsvolumen betrug 40 µl.

Die Integrität der RNA wurde zunächst mittels Gelelektrophorese eingeschätzt. Dafür wurden je 2 µl RNA-Lösung mit nukleasefreiem Wasser auf 15 µl aufgefüllt.

Die Proben wurden wie unter 2.4.2 beschrieben untersucht. Dabei sollten deutlich die 28S- und 18S-rRNA-Banden im Verhältnis 2:1 erkennbar sein.

Zudem wurde eine PCR mit 2 µl der 1:100-Verdünnung der RNA-Probe als Matrix durchgeführt (qF_SO_ACT_201-Primer, 35 Zyklen, siehe 2.4.3.1), um Verunreinigungen durch genomische DNA zu erkennen. Taq-Polymerasen benötigen DNA als Matrix. Bei reinen RNA-Proben entstehen keine spezifischen Produkte, sodass bei dem beschriebenen Vorgehen nur mit gDNA verunreinigte Proben positive Ergebnisse liefern. Die Lagerung von RNA erfolgte bei -80°C.

2.4.1.4. cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde mit dem Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR von ThermoFisher Scientific nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Dafür wurden 2 µg RNA eingesetzt. Die cDNA wurde in mehreren Aliquots 1:10 und 1:100 verdünnt und bei -80°C gelagert.

Um die Integrität der cDNA zu untersuchen wurde eine PCR mit SymHSS1-Primern (siehe 2.4.2, Tabelle 8) durchgeführt, welche ein längeres Produkt amplifizieren und näher am 5'-Ende binden als die qPCR-Primer. Bei positivem Ergebnis wurde die cDNA als intakt betrachtet. Da ein negatives Ergebnis auch aus einer zu geringen Expression von *HSS* resultieren kann, wurde für negative Proben die Untersuchung mit SymDHS1- und AH_SO-Actin-Primern wiederholt und anhand dieser Ergebnisse entschieden, ob die Proben verwendbar waren oder die cDNA-Synthese zu wiederholen war.

2.4.1.5. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am Nanodrop-Photometer bei 280 nm. Als Qualitätsparameter wurde auch das 280/260-Verhältnis und das 260/230-Verhältnis bestimmt, wodurch sich Hinweise auf Protein- und Phenolreste ergeben. Der erste Wert sollte für DNA bei 1,8-2 und für RNA bei rund 2,0 liegen, der zweite Wert über 2,0.

2.4.2. Gelelektrophorese

Agarosegele wurden mit TAE-Puffer und 1,5 oder 2% Agarose hergestellt, wobei letztere für die Trennung kleiner Fragmente um 200 bp und kleiner verwendet wurden. Dabei handelten es sich zumeist mit qPCR-Primern erzeugte PCR-Produkte. Die DNA-Proben wurden mit Ladepuffer (Fisher Scientific) gemischt und

direkt aufgetragen. RNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit RNA-Ladepuffer versetzt (5 µl auf 15-20 µl RNA-Lösung), 5 min bei 65°C denaturiert und rasch auf Eis gekühlt. Die Trennung erfolgte in TAE-Puffer bei 6,3 V/cm.

Die Gele wurden in Ethidiumbromid (Tabelle 7) gefärbt (10-20 min) und in destilliertem Wasser entfärbt (15-30 min). Anschließend erfolgte die Dokumentation des Gels unter UV-Licht.

Als Größenstandards wurden Gene Ruler 1 kb DNA Ladder und für kleine PCR-Produkte Gene Ruler 100 bp DNA Ladder (beide Fermentas) verwendet.

2.4.3. Protokolle für die Polymerasekettenreaktion

Bei der Polymerasekettenreaktion (PCR) werden durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase Sequenzabschnitte zwischen zwei Starter-Oligonukleotiden (Primern) spezifisch amplifiziert. Dabei werden, abhängig von der Menge an Matrix-DNA und der Anzahl der Reaktionszyklen, große Kopienzahlen des jeweiligen Produkts erzeugt, was sich sowohl analytisch als auch präparativ nutzen lässt.

Die Protokolle richten sich nach den Spezifikationen der Enzyme und wurden nach Anleitungen der Hersteller durchgeführt (Zusammensetzung des PCR-Ansatzes, Elongationszeit). Die Bindungstemperatur richtet sich nach den Primern und ist Tabelle 8 zu entnehmen. Bei präparativen Anwendungen für Klonierungsarbeiten wurde die Phusion® DNA-Polymerase eingesetzt, da diese eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität besitzt, was eine niedrige Fehlerrate bedingt. Qualitative analytische PCR wurde mit der DreamTaq DNA-Polymerase durchgeführt.

Primer, die nicht der Literatur entnommen wurden, wurden mit Primer3Plus¹⁰ erstellt und zunächst mit Primer-BLAST¹¹ (NCBI) auf Spezifität geprüft. Die Synthese erfolgte durch Eurofins Genomics. Die optimale Bindungstemperatur wurde über einen Temperaturgradienten bestimmt.

2.4.3.1. Qualitative Untersuchungen mittels PCR

Die qualitative PCR fand überwiegend zur Überprüfung von Plasmiden und Zellkulturen Anwendung. Sequenzen und Zielgene der verwendeten Primer sind in Tabelle 8 aufgeführt.

¹⁰ <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>, letzte Nutzung am 5.12.2016

¹¹ <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, letzte Nutzung am 5.12.2016

Aus neuen Haarwurzel-Kandidaten wurde DNA isoliert und zunächst ein Teilstück eines Beinwell-Gens, zumeist *HSS*, amplifiziert, um sicherzustellen, dass die Qualität der DNA für PCR-Anwendungen ausreicht. Anschließend wurde mit Arhi-virG20- und Agro-VC-Primern auf Kontamination mit Agrobakterien getestet. Beide Primer-Paare weisen Sequenzen des *Ri*-Plasmids nach, die nicht in das Pflanzengenom integriert werden. Fiel eine der Reaktionen positiv aus, wurde die betreffende Linie weiter antibiotisch behandelt (siehe 2.2.3) und die DNA-Probe verworfen. Bei negativem Ergebnis erfolgte der Nachweis der inserierten T-DNA durch Amplifikation von *rolB* und *rolC* in einer Multiplex-PCR¹². Linien, die mit transgenen *Agrobacterium*-Stämmen erzeugt worden waren, wurden zudem noch auf die Anwesenheit des Hygromycin-Resistenz-Gens und des miRNA-Konstrukts (Ins-pAL-mRHSS1a-Primer) überprüft.

¹² Es wurde mit beiden Primerpaaren im selben PCR-Ansatz gearbeitet. Die Bindungstemperaturen liegen nahe genug beieinander, und die Produktgrößen unterscheiden sich mit 423 und 626 bp genügend um in der Gelelektrophorese zwei klar erkennbare Banden zu erzeugen.

Tabelle 8: Primer für qualitative PCR-Untersuchungen. Aufgeführt sind die Sequenzen, Eigenschaften und Herkunft von Oligonukleotiden (Primern), die für qualitative PCR-Untersuchungen verwendet wurden. Die Paare 1-4 binden an pRi aus *Agrobacterium rhizogenes*. Die Primerpaare 5-7 binden an Beinwell-DNA. Zur Überprüfung von Klonierungsschritten und des Transformationserfolgs bei Haarwurzellinien mit artifiziellen Konstrukten (siehe 2.3.3) fanden die Paare 8-10 Anwendung, die an die T-DNA des zur Transformation verwendeten Plasmids binden. T_a ist die Bindungstemperatur (a von englisch „annealing“).

Nr.	Name	Sequenz	Zielsequenz	T _a in °C	Produkt [bp]		Bemerkungen
					gDNA	cDNA	
1	Arhi-rolB20-v Arhi-rolB20-r	GCT CTT GCA GTG CTA GAT TT GAA GGT GCA AGC TAC CTC TC	<i>rolB</i> aus <i>A. rhizogenes</i>	53,5	423		(Grąbkowska et al. 2010) Nachweis Integration T-DNA
2	Arhi-rolC20-v Arhi-rolC20-r	CTC CTG ACA TCA AAC TCG TC TGC TTC GAG TTA TGG GTA CA	<i>rolC</i> aus <i>A. rhizogenes</i>	53,5	626		(Grąbkowska et al. 2010) Nachweis Integration T-DNA
3	Arhi-virG20-v Arhi-virG20-r	ACT GAA TAT CAG GCA ACG CC GCG TCA AAG AAA TAG CCA GC	<i>VirG</i> aus <i>A. rhizogenes</i>	53,5	350		(Sidwa-Gorycka et al. 2009) Nachweis Abwesenheit <i>A. rhizogenes</i>
4	Agro-VCF Agro-VCR	ATC ATT TGT AGC GAC T AGC TCA AAC CTG CTT C	<i>VirC</i> aus <i>A. rhizogenes</i>	55	730		(Sawada, Ieki, and Matsuda 1995) Nachweis Abwesenheit <i>A. rhizogenes</i>
5	SymHSS1-v SymHSS1-r	GTT TCT TCT GGA CTG CGT GAG ACA GAC AGC AAA ATC AGC GCC TCC A	<i>HSS</i> in <i>S. officinale</i>	67	ca. 1200	603	DNA/cDNA-Qualität
6	SymDHS1-v SymDHS1-r	AGT GAA AAG GAG AAA GAG CCA GCC GAC CAA CAT GTA CAG CCT CGC CA	<i>DHS</i> in <i>S. officinale</i>	68,5		580	DNA/cDNA-Qualität
7	AH_SO-Actin-fw AH_SO-Actin-rv	TCT TGA TCT TGC TGG ACG TG CCA GGG AAC ATT GTT GAA CC	<i>Actin</i> in <i>S. officinale</i>	63	393	393	(Hauswald 2013) DNA/cDNA-Qualität
8	Hyg-2-for Hyg-2-rev	ACC GCA AGG AAT CGG TCA AT GGC GAC CTC GTA TTG GGA AT	Hygromycin-B- Phosphotransferase- Gen	in °C	280	280	Nachweis der T-DNA von pMDC32/pALmRHSS

Nr.	Name	Sequenz	Zielsequenz	T _a	Produkt [bp]		Bemerkungen
					gDNA	cDNA	
9	Ins-pAL-mRHSS1a-fw	CAG GGT TTT CCC AGT CAC GA	vorderer Teil MIR319a	60	1077	1077	Nachweis der T-DNA von pALmRHSS
	Ins-pAL-mRHSS1a-rev	TGT GTG GAA TTG TGA GCG GA	pMDC32 direkt hinter dem Nos-Terminator				
10	seq-pMDC32-prom	CGG ATT CCA TTG CCC AGC TA	35S-Promotor	60	pMDC 32	2201	überspannt die Rekombinationsstelle eingesetzt zur Überprüfung von pMDC32-0
	seq-pMDC32-term	AAT CAT CGC AAG ACC GGC A	Nos-Terminator		pMDC -32-0	419	

2.4.3.2. Expressionsuntersuchungen mittels quantitativer PCR

Die Protokolle zur quantitativen PCR (qPCR) basieren auf Dorak (2006) sowie den Herstellerangaben der verwendeten Materialien. Es wurde der 2x qPCRBIO SyGreen Mix ohne ROX (5-Carboxy-Rhodamin-X) von PCR BIO SYSTEMS verwendet. Dabei wird mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green detektiert. Die Reaktion erfolgte in weißen Quali-PCR-Tube-Streifen (Kisker Biotech). Es wurden je cDNA-Probe 2 µl einer 1:100-Verdünnung eingesetzt. Alle Proben wurden als Triplikate¹³ angesetzt. Als Positivkontrolle wurden 2 µl genomische DNA in einer Konzentration von 5 ng/µl verwendet.

Die Zusammensetzung des Reaktionsgemisches und das PCR-Programm folgten dem Herstellerprotokoll zum qPCR-Mix. Der Bindungs- und Verlängerungsschritt erfolgte bei 60°C für 30 s. Im Anschluß an die Amplifikation wurde eine Schmelzkurve aufgezeichnet, welche Rückschlüsse auf Anzahl und Größe der gebildeten Produkte erlaubt. Dafür wurde mit 1°C/s von 60-95°C geheizt.

In Tabelle 9 sind die Primer aufgeführt, die für qPCR-Analysen verwendet wurden. Grundlage waren die cDNA-Sequenzen von *HSS* und *DHS* (GenBank-Nummer AJ704851.1 und AJ704852.1). Da keine Sequenz eines geeigneten Referenzgens verfügbar war wurde als Teil einer Masterarbeit (Hauswald 2013) versucht, mit Primern für verschiedene Gene anderer Pflanzen PCR-Produkte zu erhalten und zu sequenzieren. Es konnte eine Teilsequenz von *Actin* erhalten werden, auf deren Basis die AH_SO-Actin-Primer erstellt wurden. Das Produkt dieser Primer mit cDNA und gDNA ist gleich groß, enthält also kein Intron. Die Sequenz dieses Produkts war Grundlage für die hier verwendeten qPCR-Primer qF/R_SO_ACT_201.

Um die Spezifität der qPCR-Primer zu überprüfen wurden Testläufe mit cDNA und genomischer DNA von *S. officinale* durchgeführt. Dabei ergab sich jeweils eine Bande passender Größe sowie eine klare Schmelzkurve. Es wurde auch darauf geachtet, daß mit nur einem Primer kein Produkt amplifiziert wurde.

Bei Test-PCRs der qPCR-Primer mit cDNA zeigte sich, daß qR_SO_HSS_138 auch ohne den zugehörigen Vorwärtsprimer ein Produkt erzeugt. Aus diesem Grund wurde nur qR_SO_HSS_168 eingesetzt.

Zur Bestimmung der PCR-Effizienz der Actin-, HSS- und DHS-Primer in der qPCR wurde cDNA aller Proben des Probensatzes A (siehe 2.2.5) gemischt, daraus eine Verdünnungsreihe mit acht Schritten von 1:25 bis 1:1000 hergestellt und in

¹³ drei PCR-Ansätze derselben Probe mit denselben Primern im selben Meßlauf

Triplikaten vermessen. Die Berechnung ist im folgenden Abschnitt dargestellt, die Ergebnisse unter 3.2.1.

Tabelle 9: Primer für die quantitative PCR

Name	Sequenz	Zielgen	Produktgröße cDNA	Produkt gDNA
qF_SO_HSS138	GCG CTG ATT	<i>HSS</i>	138 bp	
	TTG CTG TCT AT			
qR_SO_HSS_138	TTG TTG CAT CAC	<i>HSS</i>	138 bp	
	AAT GAA CC			
Name	Sequenz	Zielgen	Produktgröße cDNA	Produkt gDNA
qR_SO_HSS_168	AGG TTT CAG	<i>HSS</i>	168 bp mit qF_SO_HSS 138	265 bp
	CCA CCA CCA			
qF_SO_DHS_81	ATG ACG AGA	<i>DHS</i>	81 bp	ca. 700 bp
	GCT CGT ACC TG			
qR_SO_DHS_81	CTA GAG AGC	<i>DHS</i>	81 bp	ca. 700 bp
	CAT CGG TCA AA			
qF_SO_ACT_201	TCT TGA TCT TGC	<i>Actin</i>	201 bp	201 bp
	TGG ACG TG			
qR_SO_ACT_201	TCG GGC AAC	<i>Actin</i>	201 bp	201 bp
	TCG TAG TTC TT			
AL-miR319a-for	GCT CGG ACG	MIR319a	165 bp	
	CAT ATT ACA CA			
AL-miR319a-rev	AAT TTT GGC GAC	MIR319a	165 bp	
	TCG GTA TTT			

2.4.3.3. Auswertung von qPCR-Daten mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode

Die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode nach Livak & Schmittgen (2001) ist eine der am häufigsten verwendeten Auswerteroutinen für qPCR-Daten. Dabei werden die Ct-Werte¹⁴ des Zielgens mit denen des Referenzgens normiert, um Unterschiede in der cDNA-Menge auszugleichen, und die Probe mit einer Kontrolle verglichen. Es gibt zwei Formeln für die Berechnung, von denen die komplexere die tatsächlich ermittelte PCR-Effizienz mit einbezieht (Pfaffl 2001). Zunächst wird die einfachere Variante dargestellt, für die eine PCR-Effizienz von 100 % angenommen wird. Die verwendeten Formelzeichen sind in beiden Varianten gleich, ebenso wie das zugrundeliegende Prinzip.

¹⁴ Die Zyklenzahl, bei der das Signal aus dem Hintergrund hervortritt. Sie ist abhängig von der Kopienzahl. Je mehr Kopien des untersuchten Gens in der Probe vorhanden sind, desto früher erreicht die DNA-Menge und somit das Fluoreszenzsignal die Detektionsschwelle, und desto kleiner ist dementsprechend der Ct-Wert.

G – zu untersuchendes Gen

R – Referenzgen

K – Kontrolle (hier z. B. Wildtyp-Haarwurzeln)

B – „Behandlung“, hier die Linie, die mit einer Kontrolllinie verglichen werden soll

Ct – Ct-Wert; Zyklenzahl, ab der das Signal über dem Hintergrund liegt

E – PCR-Effizienz

Verwendet wurden jeweils die Mittelwerte der Ct-Werte der als Triplikat angesetzten Proben. Werte, die um mehr als 0,5 von den anderen beiden abweichen, wurden zuvor eliminiert. Unterschieden sich alle drei Werte um mehr als 0,5, so wurde ein frisches Aliquot cDNA der Probe erneut vermessen. Dies ist ein übliches Vorgehen, da eine so große Abweichung im Triplikat für einen Fehler spricht (ein Zyklus weniger entspricht der doppelten, ein Zyklus mehr der halben Menge des Zielgens in der Probe).

Zunächst wird der ΔCt -Wert, die Differenz zwischen zu untersuchendem Gen und Referenzgen, für jede einzelne Probe, einschließlich der Kontrollen, ermittelt:

$$\Delta\text{CtG}_K = \text{CtG}_K - \text{CtR}_K$$

Der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert ergibt sich anschließend aus der Differenz der ΔCt -Werte der Probe, hier der jeweiligen Haarwurzellinie, und der Kontrolle:

$$\Delta\Delta\text{CtG}_B = \Delta\text{CtG}_B - \Delta\text{CtG}_K$$

Daraus wird ein Wert berechnet, der in der Literatur als „Ratio $\Delta\Delta\text{Ct}$ “ oder „fold difference“ bezeichnet wird, bzw. im Deutschen als relative Regulation. Er gibt an, in welchem Verhältnis zur Kopienzahl des Zielgens in der Kontrolle die Kopienzahl des Zielgens in der Probe steht. Die Berechnung erfolgt mit folgender Formel:

$$\text{FD} = 2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$$

Um bei der Ermittlung der relativen Regulation die tatsächliche PCR-Effizienz mit einzubeziehen, wird folgende Formel verwendet:

$$\text{FD} = \frac{(EG)^{\text{CtGK} - \text{CtGB}}}{(ER)^{\text{CtRK} - \text{CtRB}}}$$

Dies ist vor allem dann von Bedeutung, wenn die PCR-Effizienzen der verwendeten Primerpaare deutlich unter 100 % liegen oder stark voneinander abweichen, da eine geringere PCR-Effizienz nicht zu einer Verdopplung der Kopienzahl pro Zyklus führt und somit höhere Ct-Werte erreicht werden.

Da mit den für diese Arbeit verwendeten Primerpaaren PRC-Effizienzen nahe 100 % erreicht wurden (siehe 3.2.1) konnte die erste Berechnungsmethode verwendet werden.

Eine relative Regulation von 0,5-2 bedeutet, dass sich die Expression des Zielgens in der Probe nicht von der in der Kontrolle unterscheidet. Ab einem Wert von 2 (was der doppelten Kopienzahl entspricht) wird das Gen als aufreguliert betrachtet. Unter 0,5 (der halben Kopienzahl) gilt es als abreguliert. Während Unterschiede bei aufregulierten Genen, beispielsweise zwischen zweifach und zehnfach, gut zu erfassen sind, ist die Einschätzung bei abregulierten Genen mit einer relativen Regulation zwischen 0 und 0,5 deutlich schwieriger. Deshalb werden Werte <1 zur besseren Übersichtlichkeit als $-1/\text{Wert}$ dargestellt, sodass sich z.B. für 0,5 ein Wert von -2 ergibt und statt 0,1 der Wert -10. Die Bedeutung ist jeweils die gleiche, sie ist jedoch durch die Umformung leichter zu erfassen. In der entsprechenden Darstellung der Daten (siehe Ergebnisse, 3.2.2) sind Werte >2 als aufreguliert und Werte <-2 als abreguliert erkennbar, wobei die genauen Werte das Ausmaß repräsentieren. Werte dazwischen gelten als nicht reguliert.

Die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode kam bei der Auswertung der *DHS*-Expression zum Einsatz. Als Kontrolle wurde der Mittelwert aller untersuchten SOHR-Linien (Wildtypkontrollen) im jeweiligen Probensatz gewählt.

2.4.3.4. Bestimmung der *HSS*-Expression mittels absoluter Quantifizierung

Die zweite mittels qPCR bearbeitete Fragestellung, die Bestimmung der Expression von *HSS*, ließ sich nicht mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode auswerten. Grund dafür ist die große Variation der *HSS*-Expression zwischen den Wildtyp-Haarwurzellinien, was das Festlegen einer geeigneten Kontrolle problematisch macht. Ein Mittelwert wäre in diesem Fall mit einem großen Fehler behaftet und die Auswahl einer einzelnen Linie als Kontrolle willkürlich (siehe auch Abschnitt 3.2.1 und Abbildung 35 im Ergebnisteil).

Aus diesem Grund wurde für *HSS* ein anderer Weg der Auswertung gewählt: die absolute Quantifizierung auf Grundlage einer Kalibrierung. Um eine Normierung der cDNA-Mengen durch das Referenzgen zu ermöglichen, wie sie bei der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -

Methode erfolgt, wurde anschließend für jede einzelne Probe das Verhältnis der Kopienzahlen von *Actin* und *HSS* gebildet.

Für die Kalibrierung wurden zunächst die PCR-Produkte der qF/R_SO_HSS_138/168- und AH_SO-Actin-Primer nach Herstellerprotokoll in pGEM®-T (Promega) kloniert und in *E. coli* XL1-Blue transformiert (siehe 2.3.2). Die Konzentration der resultierenden Plasmidpräparationen wurde photometrisch bestimmt und jeweils drei Verdünnungsreihen mit 10 bis 10^8 Kopien/ μ l hergestellt. Diese wurden mit der zur Untersuchung der Proben verwendeten q-PCR-Methode in Triplikaten vermessen. Abbildung 18 und Abbildung 19 zeigen die erhaltenen Daten im linearen Bereich und die ermittelten Kalibriergeraden.

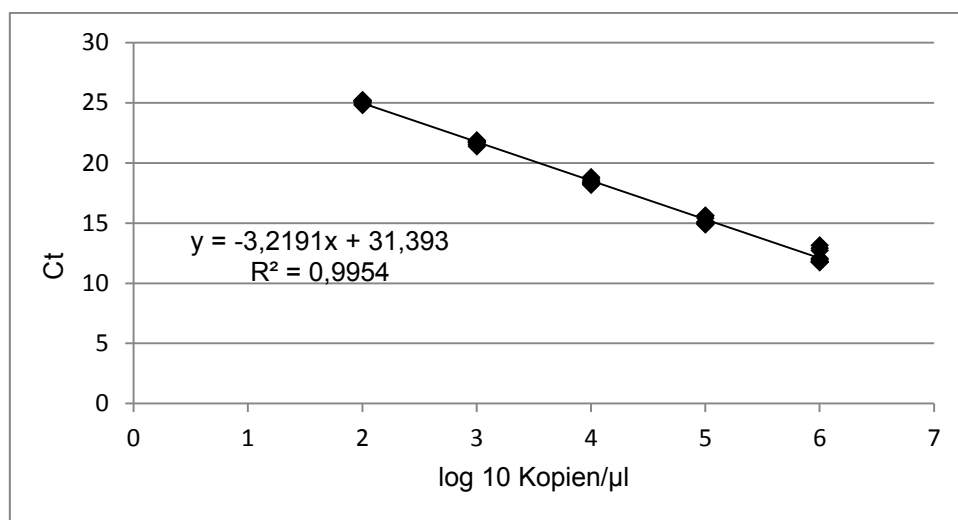


Abbildung 18: Kalibrierung für die Quantifizierung mittels qPCR von *Actin*. Enthalten sind Daten aus drei getrennt hergestellten, gemeinsam vermessenen Verdünnungsreihen.

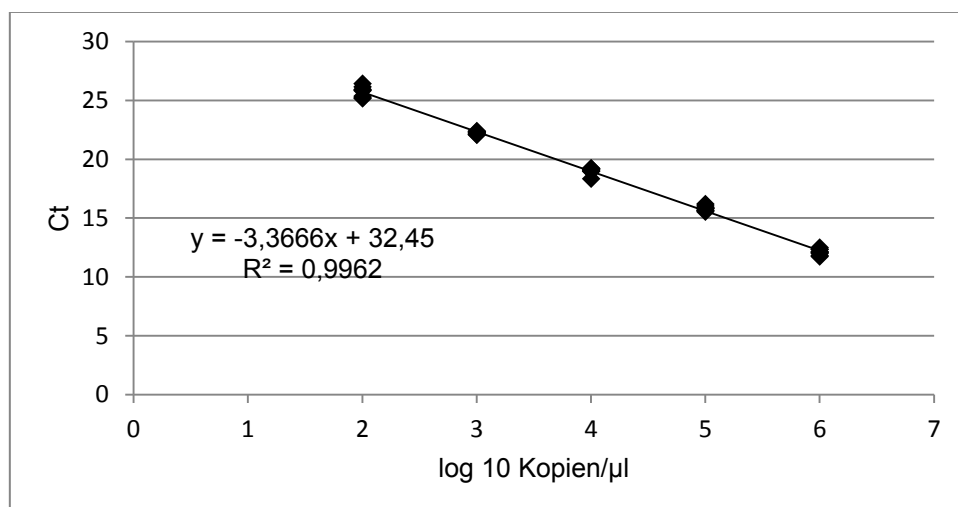


Abbildung 19: Kalibrierung für die Quantifizierung mittels qPCR von *HSS*. Enthalten sind Daten aus drei getrennt hergestellten, gemeinsam vermessenen Verdünnungsreihen.

Aus den Anstiegen wurde, wie im Abschnitt zu den Ergebnissen der Methodenetablierung (3.2.1) dargestellt, die PCR-Effizienz berechnet. Sie lag für beide Primerpaare bei $100 \pm 2\%$, was die Ergebnisse des Vorversuchs bestätigt. Aus den Daten der Triplikate wurden, wie oben für die $\Delta\Delta C_t$ -Methode beschrieben, Mittelwerte der C_t -Werte gebildet. Aus diesen wurde mittels der Kalibrierdaten die Kopienzahl für *Actin* und *HSS* berechnet:

K – Kopien

$$\begin{aligned} \lg K_{Actin} &= \frac{Ct_{Actin} - 31,939}{-3,319} & \lg K_{HSS} &= \frac{Ct_{HSS} - 32,45}{-3,367} \\ K_{Actin} &= 10^{\lg K_{Actin}} & K_{HSS} &= 10^{\lg K_{HSS}} \end{aligned}$$

Anschließend wurden die Kopienzahlen von Zielgen und Referenzgen zueinander ins Verhältnis gesetzt und die Anzahl der *HSS*-Kopien pro 1000 *Actin*-Kopien berechnet:

$$\frac{K_{HSS}}{K_{Actin}} * 1000$$

Dieser Schritt ermöglicht es, wie bei der relativen Quantifizierung mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode, mittels des Referenzgens Unterschiede der cDNA-Menge zwischen den verschiedenen Proben rechnerisch auszugleichen.

2.5. Sekundärstoffanalytik

2.5.1. Allantoinbestimmung

2.5.1.1. Probenaufbereitung

Die Extraktion von Allantoin (Abbildung 2, 1.1.2) erfolgte aus 100 mg ($\pm 10\%$, genau gewogen) gefriergetrocknetem und gemörsertem Probenmaterial mit 20 ml (Vollpipette) destilliertem Wasser durch zweistündiges Rühren bei Raumtemperatur. Anschließend wurde abfiltriert und 1 ml der wässrigen Lösung bei 50°C zur Trockne einrotiert. Der Rückstand wurde in 1 ml Acetonitril-Wasser-Gemisch (80% (V/V) Acetonitril) aufgenommen und partikelfrei filtriert (Spritzenvorsatzfilter, Nylon, Porengröße $0,2\ \mu\text{m}$). Dieser Extrakt wurde für die HPLC-Messung eingesetzt (Gerät siehe Tabelle 1).

Proben des Kulturmediums wurden genauso aufbereitet wie die wässrigen Extrakte. Diese Proben stammten aus einem Vorversuch für den Haarwurzeln in 50 ml MS-Medium im Erlenmeyerkolben angezogen wurden. Somit umfasst die für die Analyse entnommene Menge von 1 ml 1/50 der Gesamtmenge Medium pro Kulturansatz.

2.5.1.2. Gehaltsbestimmung mittels HPLC

Die Trennung erfolgte in Anlehnung an Zaidi et al. (1982) auf einer Eurospher 100-5 NH₂-Säule (250x4,6 mm, Knauer) isokratisch mit einem Gemisch von 80% Acetonitril und 20% Wasser bei einer Flussrate von 1 ml/min. Detektiert wurde bei 205 nm. Für jede Messung wurden drei Mal 50 µl aus jeder Probe injiziert. Nach jeweils drei Probeninjektionen wurde mit einem Gradienten bis 90 % Wasser gespült. Anschließend wurde eine 0,1 mg/ml Lösung von Allantoin als externer Standard injiziert, um Unregelmäßigkeiten erkennen zu können und die exakte Retentionszeit für die Identifizierung des Allantoin-Peaks in den Proben zu bestimmen.

Für die Kalibrierung wurden drei Mal Allantoinlösungen in 80% Acetonitril in acht Konzentrationen von 0,02 bis 0,5 mg/ml hergestellt. Jede Probe wurde drei Mal injiziert und aus den Wiederholungsmessungen ein Mittelwert gebildet. Die resultierenden Peakflächen wurden gegen die Konzentration der Proben aufgetragen und im linearen Bereich (0,02-0,2 mg/ml) die Regressionsgerade ermittelt. Halbjährlich wurde eine kleinere Konzentrationsreihe mit 4-5 Proben vermessen und mit den Kalibrierdaten verglichen um zu überprüfen, ob die ermittelten Flächen noch mit der Kalibrierung übereinstimmen.

Die graphische Darstellung der Daten zeigte eine zunehmende Sättigung oberhalb von 0,2 mg/ml Allantoin in der Probe (Abbildung 20). Aus diesem Grund wurden für die Berechnung der Kalibriergeraden nur die Daten für eine Allantoinkonzentration von 0,02 bis 0,2 mg/ml herangezogen. Die Darstellung der linearen Regression zeigt Abbildung 21.

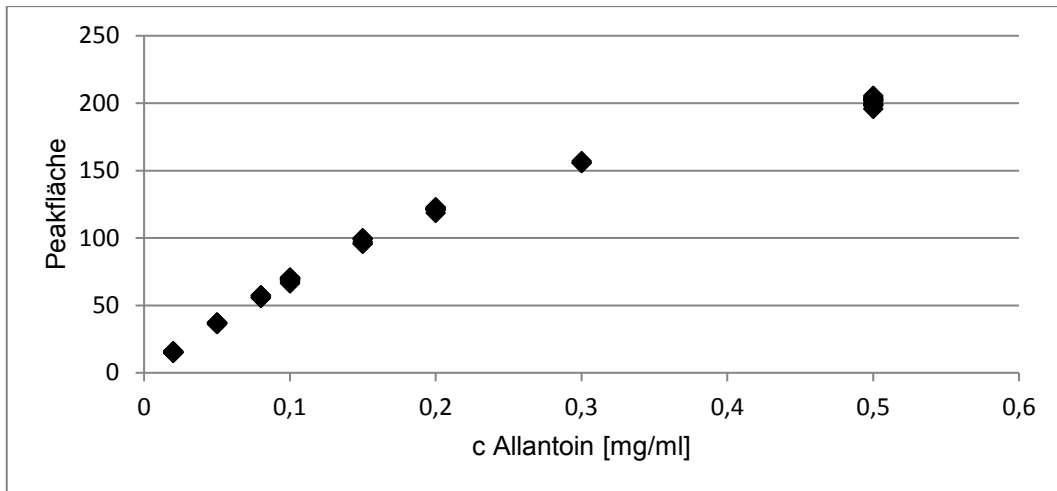


Abbildung 20: Peakfläche bei verschiedenen Allantoinkonzentrationen nach Trennung mittels HPLC und Detektion der Absorption bei 206 nm. Jede Standardlösung wurde mindestens drei Mal unabhängig voneinander hergestellt und vermessen. Ab 0,2 mg/ml tritt bei dieser Methode eine Sättigung ein.

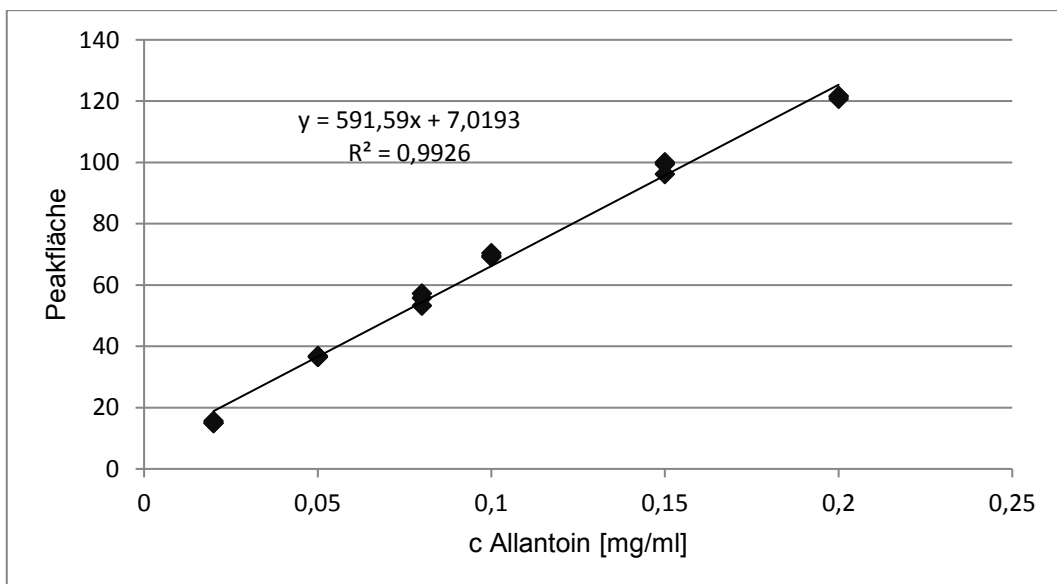


Abbildung 21: Kalibriergerade für Allantoin. Die Daten sind die gleichen wie in Abbildung 20, jedoch wurde nur der lineare Bereich für die Kalibrierung genutzt.

Daraus ergab sich folgende Berechnung:

$$c_E = \frac{A - 7,0193}{591,59}$$

$$c_P = \frac{c_E \times F_v}{E \times 1000}$$

E	Einwaage in mg Trockenmasse
F _v	Verdünnungsfaktor
A	Peakfläche
c _E	Allantoinkonzentration im Extrakt in mg/ml
c _P	Allantoingehalt in der Probe in mg/g Trockenmasse

Der Verdünnungsfaktor ergibt sich aus 20 ml Wasser für die Extraktion einer Probe sowie einer eventuellen Konzentrierung oder Verdünnung bei der Herstellung der Probenlösung. Aus einer Verdünnung von 1:2 folgt insgesamt ein Verdünnungsfaktor von 40.

Zur Optimierung der Extraktion wurde Wurzel- und Kulturmateriale homogenisiert und in mehrere Proben aufgeteilt, sodass Material gleichen Allantoingehalts unter verschiedenen Bedingungen extrahiert werden konnte (Ergebnisse in 3.3.1.1).

2.5.2. Quantifizierung der Pyrrolizidinalkaloide

Zur Bestimmung des Gesamtgehalts an Pyrrolizidinalkaloiden (PA) wurde die durch Kempf et al. (2008) und Cramer & Beuerle (2012) beschriebene Methode genutzt. Dabei werden die zahlreichen PA und PA-N-Oxide in der Probe mittels LiAlH_4 zu Retronecin (R-Enantiomer) beziehungsweise Heliotridin (S-Enantiomer) reduziert (Abbildung 22) und können gemeinsam erfasst werden. Obwohl sich Retronecin und Heliotridin nur in der sterischen Konfiguration einer Hydroxylgruppe unterscheiden können sie mittels Gaschromatographie getrennt werden. Somit ist die Verwendung von Heliotrin als interner Standard möglich, um die Effizienz bei Extraktion, Derivatisierung und die massenspektrometrische Detektion zu bestimmen. Allerdings würden Heliotridin-Typ-PA aus der Probe zu überhöhten Messwerten des internen Standards führen. Die Literatur (siehe 1.2.1, (Röder 1995; Wuilloud et al. 2004)) ließ für *Symphytum* das Fehlen von Heliotridin-Typ-PA oder das Vorkommen in geringen Mengen (unter der Nachweisgrenze der verwendeten Methode) erwarten, was experimentell bestätigt wurde. Zu diesem Zweck wurden Proben verschiedener Pflanzenteile und Kulturlinien geteilt und sowohl mit, als auch ohne Heliotrinzusatz analysiert.

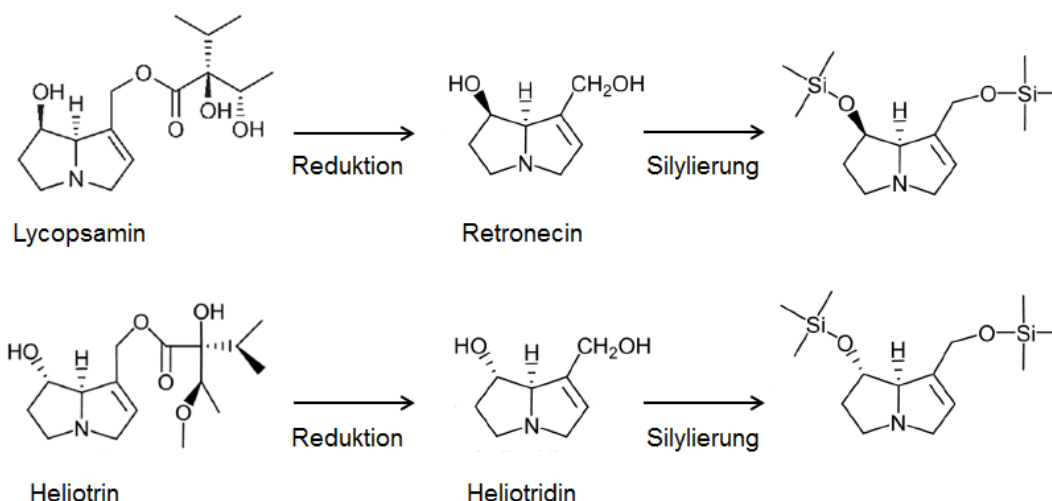


Abbildung 22: Derivatisierung der Pyrrolizidinalkaloide während der Probenaufbereitung. Die Pyrrolizidinalkaloide werden während der Reduktion mit LiAlH_4 in ihre Necinbasen überführt. Aus dem internen Standard (Heliotrin) entsteht Heliotridin, aus den in der Probe enthaltenen PA (z.B. Lycoposamin) Retronecin. Beide Substanzen werden anschließend in die jeweiligen di-Trimethylsilyl-Derivate überführt. (verändert nach Kempf et al. (2008))

Die Extraktion orientierte sich an der Methode von Cramer et al. (2013). Zunächst wurden zu 100 mg gefriergetrocknetem Probenmaterial 10 µg Heliotrin in Methanol hinzugegeben. Zur Extraktion der PA wurde 3 min mit 6 ml 0,05 M Schwefelsäure geschüttelt, 10 min bei 4000xg zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Es wurde drei Mal extrahiert und die Überstände vereinigt. Für die darauf folgende Reinigung mittels Festphasenextraktion wurden die Säulen (Kationentauschersäulen Chromabond® HR-XC 6 ml/500 mg, Machery-Nagel) mit 6 ml Methanol und 6 ml 0,05 M Schwefelsäure vorkonditioniert und dann mit den Proben beladen. Anschließend wurde mit 12 ml Wasser und 12 ml Methanol gewaschen. Die Elution erfolgte mit 18 ml ammoniakalischem Methanol (Tabelle 10). Die Eluate wurden am Rotationsverdampfer bei 30°C bis auf ca. 2 ml eingengt, in Reagenzgläser mit Schraubverschluss überführt und unter Stickstoffstrom zur Trockne eingengt.

Tabelle 10: Lösungen für die Extraktion und Derivatisierung der Pyrrolizidinalkaloide

Substanz / Zubereitung	Zusammensetzung
Ammoniakalisches Methanol	6 ml konzentrierter Ammoniak auf 100 ml Methanol
Natriumhydroxid	10% m/m in destilliertem Wasser
Schwefelsäure	0,05 M in destilliertem Wasser

Für die Überführung der PA in die Necinbasen wurden die getrockneten Extrakte in je 100 µl Methanol zurückgelöst und vorsichtig mit 600 µl

Lithiumaluminiumhydrid-Lösung (LiAlH_4) versetzt. Die Proben wurden gemischt (Vortex) und 30 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden 200 μl Natronlauge (10 % m/m) zugegeben und gründlich gemischt, um überschüssiges LiAlH_4 zu entfernen. Das Gemisch wurde mit 0,7 g Natriumsulfat getrocknet und fünf Mal mit Dichlormethan extrahiert. Die Extrakte wurden über Glaswolle filtriert, gesammelt und unter Stickstoff zur Trockne eingedampft.

Die Silylierung erfolgte mit je 100 μl MSTFA für 30 min bei 40°C . Anschließend wurden 10 μl der Probe 1:10 mit Essigsäureethylester verdünnt und der Rest unverdünnt in Probengläschen überführt. Sowohl die verdünnte, als auch die unverdünnte Probe wurden am GC-MS gemessen (siehe folgender Absatz und Tabelle 1). War die PA-Konzentration auch in der verdünnten Probe zu hoch für eine Quantifizierung, so wurde eine weitere Verdünnung, die Werte im Meßbereich erwarten ließ, hergestellt und vermessen.

Die Trennung erfolgte auf einer Agilent HP-5 30 m / 0,250 mm / 0,25 μm Säule mit 1 ml/min Helium bei folgendem Programm: drei Minuten bei 100°C , dann Temperaturanstieg um $6^\circ\text{C}/\text{min}$ bis 310°C . Diese Temperatur wurde weitere drei Minuten gehalten. Das Injektionsvolumen betrug 1 μl . Jede Probe wurde drei Mal mittels Autosampler injiziert. Die Injektortemperatur betrug 250°C . Es wurde splitlos injiziert. Nach 0,75 min wurde das Splitverhältnis auf 1:100 erhöht und 4,5 min nach der Injektion auf 1:10 zurückgefahren. Die Temperatur der Transferline zwischen Gaschromatograph und Massenspektrometer lag bei 280°C . Im Ionenfallen-Massenspektrometer erfolgte die Ionisierung mittels Elektronenstoß (EI, 70 eV). Die Temperatur der Ionenfalle lag bei 200°C .

Die Detektion von Retronecin und Heliotridin erfolgte im Single Ion Selection (SIS)-Modus. Es ergeben sich jeweils drei typische Massenpeaks, 93, 183 und 299, die mit ± 1 erfasst wurden. Für die Quantifizierung wurden m/z^{15} 182 bis 184 und 298 bis 300 genutzt. Typische Chromatogramme und Massenspektren sind unter Ergebnisse (3.3.2.1) zu finden.

2.5.2.1. Kalibrierung

Die Kalibrierung gestaltete sich dadurch aufwendig, daß zwar Retronecin kommerziell verfügbar war, nicht jedoch Heliotridin, die Necinbase des internen Standards Heliotrin. Somit konnte die Standardfläche nicht mit silyliertem Heliotridin ermittelt werden, sondern es war zuvor die Reduktion durchzuführen. Die Ausbeute dieses Arbeitsschrittes wurde als variabel angenommen, was sich

¹⁵ Masse-Ladungs-Verhältnis

im Laufe der Arbeiten mit dieser Methode bestätigt. Aus diesem Grund wurde die Strategie gewählt, zunächst eine Kalibrierung mit silyliertem Retronecin aufzunehmen, der Necinbase der zu messenden Pyrrolizidinalkaloide (Abbildung 23). Die Kalibrierung mit Retronecin erfolgte im Bereich von 0,1 bis 10 µg, entsprechend 0,64 bis 64,44 nmol pro Probe. Die Substanz wurde in Methanol gelöst, die entsprechende Menge im Probengläschen eingedampft, silyliert und eingespritzt.

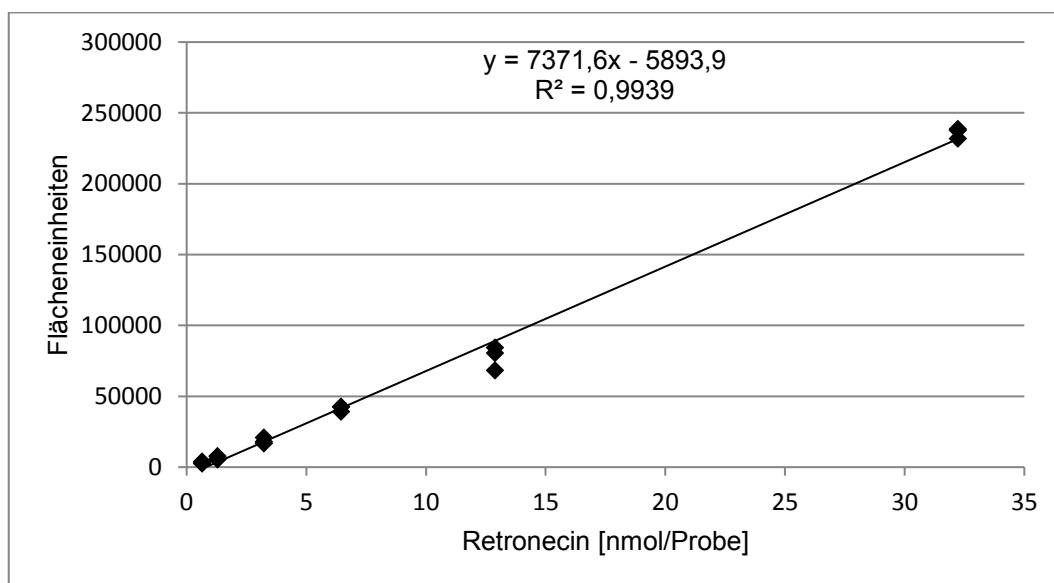


Abbildung 23: Kalibriergerade Retronecin. Dargestellt sind Mengen von 0,1 bis 5 µg (Probenmenge vor Silylierung; injiziert wurde 1 µl von 100 µl Lösung nach der Silylierung). Die Stoffmenge wurde in nmol umgerechnet, um den Vergleich mit Monocrotalin, Heliotrin und Heliotridin zu ermöglichen.

Da Heliotridin nicht verfügbar war mußte die korrespondierende Fläche des internen Standards indirekt bestimmt werden. Dafür wurden in einem zweiten Schritt Mischungen bekannter Mengen von Heliotrin und Monocrotalin (ein PA mit Retronecin als Base) in unterschiedlichen Verhältnissen hergestellt, mit LiALH₄ reduziert, silyliert und vermessen. Die genaue Probenzusammensetzung ist Tabelle 11 zu entnehmen. Es wurden Daten dreier Messreihen verwendet. Anhand der Verhältnisse der molaren Massen und der Kalibriergeraden für Retronecin ließ sich die Wiederfindung für Monocrotalin berechnen, welches in diesen Versuchen als interner Standard diente. Mit dieser Wiederfindung wurde die Peakfläche von Heliotridin korrigiert und anschließend zur Einwaage in Bezug gesetzt. Die so ermittelten Peakflächen für Heliotrin sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 11: Alkaloidgemische für die Bestimmung der Peakfläche des internen Standards. Jede Zeile enthält eine verwendete Kombination von Monocrotalin und Heliotrin unter Angabe der verwendeten Masse und der entsprechenden Stoffmenge.

Monocrotalin [μg]	Monocrotalin [nmol]	Heliotrin [μg]	Heliotrin [nmol]
0,2	0,61	1	3,19
0,5	1,54	1	3,19
1	3,07	5	15,95
2	6,15	5	15,95
5	15,37	10	31,91
10	30,74	10	31,91

Tabelle 12: Peakfläche Heliotrin. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte über sechs Proben sowie Standardabweichung und Variation.

Heliotrin [μg]	Heliotrin [nmol]	Peakfläche	Standard- abweichung	Variations- koeffizient [%]
1	3,19	9.921	689	6,9
5	15,95	52.575	5.607	10,7
10	31,91	122.268	7.767	6,4

Zur Berechnung des Alkaloidgehalts der Probe wurden zunächst die Peakflächen von Retronecin und Heliotridin ermittelt. Die Integration erfolgte automatisch durch die Analysensoftware (Varian MS Workstation Version 6.9.3, siehe 2.1.1). Es wurde jeweils mit dem Mittelwert dreier Injektionen derselben Probe gearbeitet.

A_R Fläche Retronecin

A_H Fläche Heliotridin

n_H Stoffmenge Heliotridin: 31,91 nmol (entspricht 10 μg Heliotrin)

F Korrekturfaktor: 1,9 (siehe unten und Tabelle 13)

E Einwaage in mg Trockenmasse

M molare Masse, berechnet als Retronecin oder PA-Mischung: 155 g/mol (Retronecin) oder 380 g/mol (mittlere Molmasse von Pyrrolizidinalkaloiden)

$$\frac{A_R}{A_H} \times n_H = c \left[\frac{\text{nmol}}{\text{Probe}} \right]$$

$$\frac{c \left[\frac{\text{nmol}}{\text{Probe}} \right]}{E} \times 1000 = c \left[\frac{\text{nmol}}{\text{g}} \right]$$

$$\frac{c \left[\frac{\text{nmol}}{\text{g}} \right]}{1000} \times M = c \left[\frac{\mu\text{g Substanz}}{\text{g Trockenmasse}} \right]$$

Dabei wurde die Menge Retronecin in der Probe, die der Menge der enthaltenen PA entspricht, über das Verhältnis der Peakfläche zu der des internen Standards ermittelt. Aus der Gegenüberstellung der ermittelten Flächen in den Vorversuchen ergab sich, dass gleiche Stoffmengen der beiden Necinbasen Retronecin und Heliotridin zu unterschiedlichen Peakflächen führen. Über die Berechnung des Verhältnisses beider Flächen für drei verschiedene Stoffmengen in der Probe wurde ein Korrekturfaktor ermittelt (siehe Tabelle 13), um diesen Unterschied auszugleichen.

Die sich ergebende Stoffmengenkonzentration wurde schließlich in Retronecin umgerechnet. Der Literatur folgend (Cramer et al. 2013) wurde mit einer mittleren molaren Masse für PA auch die Menge des nicht reduzierten PA-Gemisches (näherungsweise) berechnet.

Tabelle 13: Ermittlung des Korrekturfaktors. Die Tabelle zeigt die eingesetzten Stoffmengen und ermittelten Peakflächen für Heliotrin und Retronecin. Hinzu kommen die korrigierten Flächen für Heliotrin, die mittels Verhältnisgleichung an die verwendeten Stoffmengen von Retronecin angepaßt wurden. Der Korrekturfaktor ergab sich aus dem Verhältnis der Flächen von Retronecin und Heliotrin bei gleicher Stoffmenge. Das Verhältnis ist über die drei untersuchten Stoffmengen nahezu gleich. Der sich ergebende Mittelwert von gerundet 1,9 wurde für die Berechnungen verwendet.

Heliotrin Probe [nmol]	ermittelte Fläche Heliotrin	Heliotrin korrigiert [nmol]	korrigierte Fläche Heliotrin	Retronecin Probe [nmol]	ermittelte Fläche Retronecin	A _R :A _H
3,19	9.921	3,22	10.012	3,22	18.463	1,84
15,95	52.575	12,89	42.477	12,89	77.581	1,83
31,91	122.268	32,22	123.459	32,22	236.020	1,91
Mittelwert:						1,86

Die letztlich verwendeten Kalibrierreihen wurden unmittelbar nacheinander pipettiert und getrocknet. Danach konnten in mehreren Arbeitsgängen Kalibrierproben rückgelöst und derivatisiert werden, da dabei nur eine begrenzte Anzahl Proben gleichzeitig handhabbar ist. Um sicherzustellen, dass die Proben untereinander vergleichbar sind, wurden diese (in zeitlicher Nähe zur Kalibrierung) alle in einem Arbeitsgang und aus einer Charge verdünnter Lösung mit dem internen Standard versehen.

3. Ergebnisse

Zum besseren Verständnis der im folgenden Kapitel dargestellten Daten wird hier noch einmal kurz auf die Herkunft der Haarwurzellinien und die Sammlung des daraus gewonnenen Probenmaterials eingegangen.

Die Herstellung der Kulturen erfolgte, wie geschildert (2.2), durch Inokulation von *Symphytum officinale*- oder *S. x uplandicum*-Blattexplantaten mit verschiedenen *Agrobacterium*-Stämmen. Dabei wurde entweder mit einem Wildtyp-Stamm, der das Ri-Plasmid trug, oder mit einem von mehreren transformierten Stämmen gearbeitet, die neben pRi ein zweites Plasmid mit einem künstlichen Konstrukt zwischen den Border-Sequenzen enthielten. Wie in Abbildung 24 illustriert, kann ein Transformationsereignis in diesem Fall zu drei verschiedenen Ergebnissen führen. Es kann jeweils eine der beiden T-DNAs (gegebenenfalls mit mehreren Kopien) übertragen werden, oder beide. Die natürliche Ri-T-DNA allein induziert die Bildung einer Haarwurzellinie, die jedoch bei der nachfolgenden Selektion mit Hygromycin B abstirbt. Wird nur die artifizielle T-DNA übertragen, so entsteht keine Haarwurzel. Die damit transformierten Zellen sind bei der Beobachtung der Blattexplantate nicht erkennbar und werden letztlich mit diesen entsorgt. Werden, wie gewünscht, beide T-DNAs übertragen, so entsteht eine Haarwurzel, die resistent gegen Hygromycin B ist und somit die nachfolgende Selektion überlebt. Diese Linien wurden wie in 2.2 beschrieben mittels PCR bestätigt und mit der in Tabelle 15 dargestellten Nomenklatur benannt.

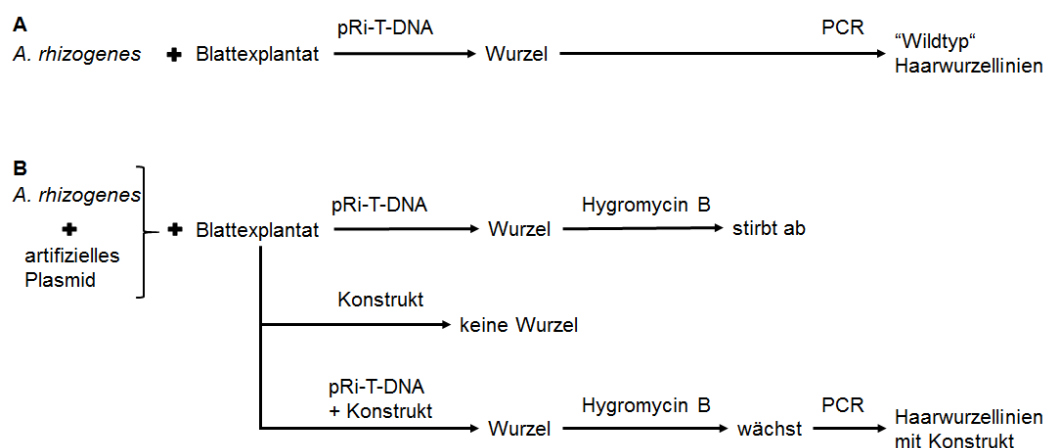


Abbildung 24: Schema Kulturerzeugung. Teil A zeigt die Erzeugung von „Wildtyp“-Haarwurzelkulturen durch die Inokulation von *Symphytum*-Blattexplantaten mit Wildtyp *Agrobacterium rhizogenes*. In Teil B ist die Erzeugung von Haarwurzeln mit zusätzlichem Transgen dargestellt. Die verwendeten *Agrobacterium*-Stämme enthielten neben pRi ein weiteres Plasmid mit artifizeller T-DNA. Bei einem Transformationsereignis können beide T-DNAs oder nur eine übertragen werden, dargestellt durch die drei Pfeile. Erläuterungen siehe Text.

Es wurden jeweils mehrere unabhängige Haarwurzellinien von *S. officinale* mit drei verschiedenen miRNA-Konstrukten hergestellt, sowie als Kontrollen Linien mit einem „leeren“ Plasmid (pMDC32-0, siehe 2.3.3.2) und ausschließlich mit Wildtyp-Bakterien.

Die Gewinnung von Probenmaterial der untersuchten Haarwurzellinien erfolgte nach zweiwöchigem Wachstum in Schüttelkultur wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben. Um möglichst viele Daten aus demselben Material zu gewinnen wurde wie in Abbildung 25 dargestellt vorgegangen:

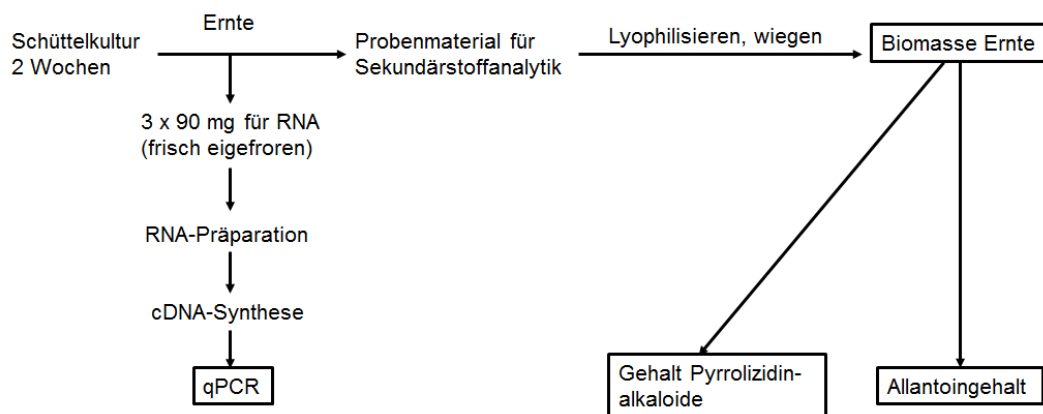


Abbildung 25: Übersicht zur Probengewinnung und-Analyse. Die Abbildung zeigt den Weg von der Kultivierung der Haarwurzeln zur Analyse von Genexpression und Sekundärstoffgehalt. Durch dieses Vorgehen konnten jeweils *HSS*-Expression, Alkaloidgehalt und Allantoingehalt derselben Probe bestimmt werden.

Dabei wurden sofort bei der Ernte drei Proben für die RNA-Extraktion eingefroren. Diese Menge fehlt bei der späteren Ermittlung des Trockengewichts. Es handelt sich um rund 270 mg Frischmasse, was bei 95 % Wassergehalt rund 1,4 mg Trockenmasse entspricht. Das sind für 36 von 39 Linien weniger als 1 % der jeweiligen Proben, und somit für die Beurteilung der Biomasseakkumulation in Abschnitt 3.1.2.3 unerheblich. Das getrocknete und gewogene Material wurde anschließend für die Sekundärstoffanalytik aufgeteilt. Auf diese Weise können Expressionsdaten (3.2.2), PA-Gehalt (3.3.2.2), Allantoingehalt (3.3.1.3) und ein Wachstumsparameter (3.1.2) jeweils für eine Probe zusammengeführt werden.

3.1. Erzeugung und Untersuchung der Haarwurzelkulturen

3.1.1. Herstellung der Kulturen

Die Kulturen wurden wie in Abschnitt 2.2 beschrieben hergestellt. Es wurden je Versuchstag 40 bis 60 Explantate inokuliert und auf MS-Agar gelegt. Dies wurde für jede Kombination aus Pflanzenart (*S. officinale* bzw. *S. x uplandicum*) und Bakterienstamm 2-3 Mal durchgeführt. Die ersten Wurzeln zeigten sich an einigen Explantaten bereits nach zwei Wochen. Diese waren jedoch in der Regel nicht ohne das ursprüngliche Blattexplantat auf MS-Agar lebensfähig. Haarwurzelkandidaten, die allein auf hormonfreiem Medium wuchsen, erschienen 4-6 Wochen nach Inokulation. Die Explantate wurden entsorgt wenn sie abstarben oder nachdem genug Kulturkandidaten für die jeweilige Kombination von Pflanze und Bakterienstamm vorhanden waren.

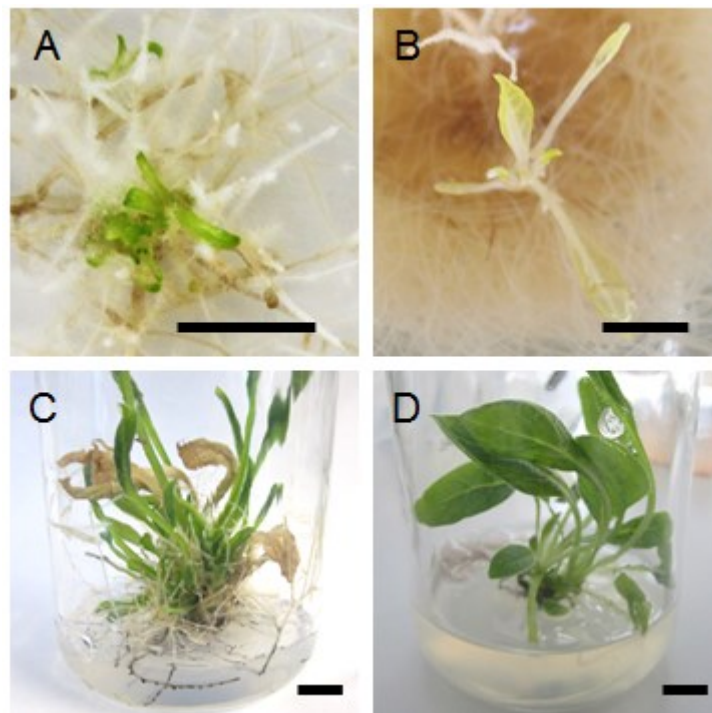


Abbildung 26: Pflanzen aus Haarwurzeln. Die Fotos zeigen Pflanzen, die sich gelegentlich in *S. officinale*-Haarwurzelkulturen bilden. A Kultur auf festem Medium (Petrischale); B Flüssigkultur; C Pflanze nach Umsetzen und Weiterkultivieren im Magentaglas; D Wildtyp-Pflanze im Magentaglas (Maßstab: 1 cm). In Bild C ist deutlich der fehlende Gravitropismus der Haarwurzeln zu erkennen.

Es fiel auf, daß sich an verwundeten Explantaten von *S. officinale* häufig kleine Pflanzen bildeten, die sich leicht abnehmen und steril weiterkultivieren ließen.

Größere Pflanzen konnten auf Erde umgesetzt werden. Auch in Haarwurzelkulturen, die in Schüttelkultur angezogen wurden, wurden gelegentlich kleine Pflanzen gefunden. Nach Weiterkultivieren dieser Pflanzen, zunächst auf MS-Medium, später auf Erde, wurde ein veränderter Phänotyp beobachtet (Abbildung 26, Abbildung 27). Die Pflanzen zeigten eine veränderte Wurzelarchitektur, gewellte Blätter und insgesamt ein gedrungenes Wachstum. Das entspricht älteren Beobachtungen an Tabak (Tepfer 1984). Der Metabolismus der Pflanzen wurde nicht untersucht.



Abbildung 27: Beinwellpflanze mit und ohne *rol*-Gene. Die Bilder zeigen in Erde gewachsene *S. officinale*-Pflanzen. Pflanze A wurde aus einer Haarwurzelkultur gezogen. Im Vergleich dazu zeigt Teil B eine Wildtyp-Pflanze (die hellbraunen Wurzeln sind ca. 1 cm dick). Gut sichtbar ist der gedrungene Habitus von Pflanze A sowie die leicht gewellten Blätter und die veränderte Architektur des Wurzelsystems.

Die Selektion der gentechnisch modifizierten Linien erfolgte durch Behandlung mit Hygromycin B, um das Vorhandensein des auf der T-DNA der künstlichen Plasmide enthaltenen Hygromycinresistenzgens zu prüfen (siehe Plasmidkarten in 2.3.3.2, z.B. Abbildung 15). Hierfür wurde zunächst in einem Vorversuch an mit Wildtyp-Bakterien erzeugten Haarwurzeln (Gruppe SOHR, siehe Tabelle 15) eine Konzentration ermittelt, die *S. officinale*-Haarwurzeln zuverlässig abtötet. Dabei erwies sich 100 mg/l Hygromycin B als geeignet. Bei der Untersuchung der genomischen DNA hygromycinresistenter Haarwurzelkandidaten mittels PCR

(siehe Methoden 2.2.3) wurden keine falsch positiv getesteten Linien gefunden, was die Eignung der gewählten Konzentration zur Selektion bestätigt. Nach zwei Wochen auf hygromycinhaltigem Medium zeigten resistente Linien deutliches Wachstum, während nicht resistente abstarben (Abbildung 28).

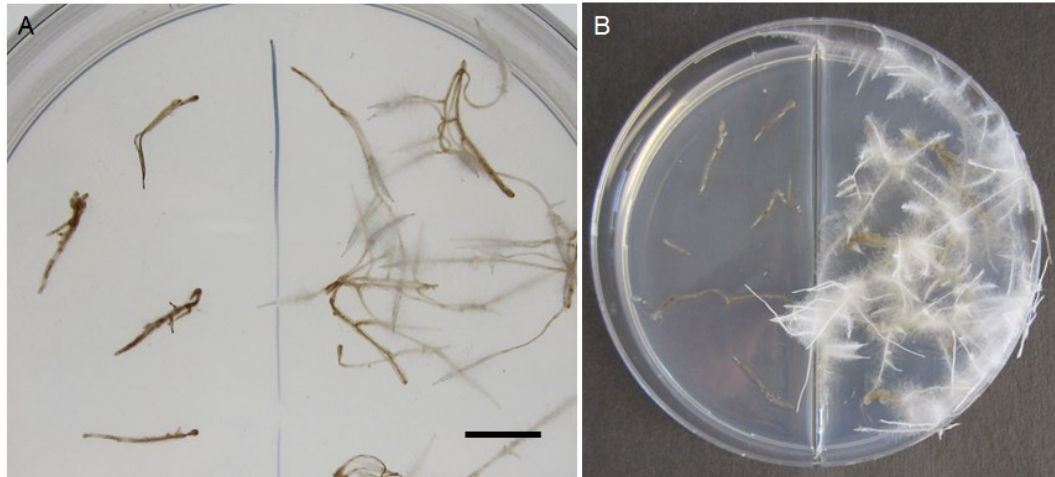


Abbildung 28: Test auf Hygromycinresistenz. In Teil A sind zwei verschiedene Haarwurzellinien, die mit transgenen Agrobakterien erzeugt wurden, auf hygromycinhaltigem MS-Agar (100 mg/l) zu sehen. Die Wurzeln auf der linken Hälfte sind abgestorben, enthalten also keine funktionelle Hygromycinresistenz, während die auf der rechten Seite wachsen. Maßstab: 1 cm; Teil B zeigt zum Vergleich eine Petrischale (Durchmesser: 9 cm) mit hygromycinhaltigem MS-Medium und der Wildtyp-Linie SOHR-22 auf der linken sowie der transgenen Linie SO-HSS1a-HR-2 auf der rechten Seite nach zwei Wochen. Die Wildtyp-Haarwurzeln sind abgestorben, die transgenen hingegen gewachsen.

Der Vergleich der hygromycinresistenten Haarwurzelkandidaten mit der Gesamtzahl der getesteten Linien ergab eine Transformationseffizienz zwischen 31 und 67% (Tabelle 14). Dieser Anteil an Wurzellinien, die wahrscheinlich die Wildtyp-T-DNA trugen, hatte auch die künstliche T-DNA des zweiten Plasmids (siehe 2.3.3.2) aufgenommen. Diejenigen der selektierten Linien, die mittels PCR auf pRi und das Konstrukt untersucht wurden, waren alle positiv. Wie häufig nur das Konstrukt, nicht jedoch die Wildtyp-T-DNA übertragen wurde, konnte nicht ermittelt werden. Zur Einordnung dieser Werte im Vergleich mit anderen Pflanzen siehe Abschnitt 4.1.

Die mittels PCR bestätigten, weiter verwendeten Linien und deren Nomenklatur sind in Tabelle 15 dargestellt. Für die Gruppen SOHR und SO-HSS1a wurde jeweils etwa die doppelte Anzahl Linien mittels PCR bestätigt und in Vorversuchen auf Wachstum und Allantoinbildung untersucht. Die Anzahl wurde nachträglich reduziert, wobei darauf geachtet wurde, hauptsächlich Linien zu eliminieren, die

vom gleichen Explantat stammten wie andere, die erhalten wurden. So sollten Dopplungen ausgeschlossen werden.

Tabelle 14: Transformationseffizienz. Die Tabelle zeigt für die verwendeten Kombinationen von Pflanze und Konstrukt die Anzahl der auf hygromycinhaltigem Medium getesteten Wurzeln sowie der resistenten Linien. Es wurden weniger Wurzeln getestet als insgesamt von den Explantaten abgenommen (Spalte 2), weil zuvor diejenigen eliminiert wurden, die nicht auf MS-Medium weiterwuchsen. Waren genug bestätigte Linien für die Gruppe vorhanden, so wurden die übrigen Wurzeln entsorgt, ohne weitere zu testen.

Gruppe	Abgenommene Wurzeln	auf Hygromycin-medium getestet	hygromycin-resistent	Anteil resistent
<i>S. x uplandicum</i> miRhss1a	183	82	30	37%
<i>S. officinale</i> miRhss1a	219	95	29	31%
<i>S. officinale</i> miRhss2	109	84	56	67%
<i>S. officinale</i> miRhss4a	26	25	16	64%
<i>S. officinale</i> pMDC32-0	214	25	9	36%

Tabelle 15: Gesamtübersicht der bestätigten und weiterkultivierten Haarwurzelkulturen. Die Tabelle zeigt die bestätigten, in dieser Arbeit untersuchten Haarwurzelkulturen. Dargestellt sind die verschiedenen Gruppen mit Stammpflanze, Konstrukt und Nomenklatur sowie die Nummerierung der jeweils vorhandenen Linien. SO – *S. officinale*; SU – *S. x uplandicum*; -HSS1a/2/4a – mit gegen HSS gerichteter miRNA + Konstruktnummer; 32-0 – mit pMDC32-0 erzeugt ("leere" T-DNA); HR - *Hairy Root*, Haarwurzelkultur

Pflanze	Konstrukt	Name	Linien (Nummern)
<i>S. officinale</i>	- (nur Wildtyp-Bakterien)	SOHR	1, 5, 9, 14, 16, 17, 22
<i>S. x uplandicum</i>	- (nur Wildtyp-Bakterien)	SUHR	1, 3, 4, 5
<i>S. officinale</i>	„leerer“ Vektor (pMDC32-0)	SO-32-0-HR	1-6
<i>S. officinale</i>	miRhss1a	SO-HSS1a-HR	1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 25
<i>S. x uplandicum</i>	miRhss1a	SU-HSS1a-HR	1, 2, 3, 5, 6, 9, 12
<i>S. officinale</i>	miRhss2	SO-HSS2-HR	1-6
<i>S. officinale</i>	miRhss4a	SO-HSS4a-HR	1-5

Um die Aufbewahrung der Haarwurzelkulturen ohne häufiges Umsetzen zu ermöglichen, wurde die Lagerung bei 8°C getestet (siehe 2.2.6 zweiter Abschnitt). Tatsächlich ist es so möglich, das Wachstum der Kulturen zu verlangsamen, ohne dass diese absterben. Selbst nach sechs Monaten waren noch 45 von 46 Kulturen am Leben. Allerdings bereitete das Weiterkultivieren bei 26°C Probleme, vor allem durch bakterielle Kontaminationen. Dies betraf nach drei und vier Monaten 20 bzw.

21 der Kulturen. Nach sechs Monaten waren nach Umsetzen und Kultivierung für eine Woche unter Normalbedingungen nur fünf Platten nicht von Kontaminationen betroffen. Nur vier dieser fünf Kulturlinien (SUHR-1, SOHR-14, SOHR-16 und SO-HSS4a-HR-1) zeigten in keinem der drei Versuchsansätze Kontaminationen beim erneuten Anziehen. Somit ist eine längerfristige Lagerung der Kulturen bei niedrigen Temperaturen möglich, jedoch muß das Bakterienwachstum verhindert werden, beispielsweise über Antibiotikabehandlung.

3.1.2. Wachstum und Biomasseakkumulation

Die Biomasseakkumulation ist eine wichtige Eigenschaft von Zell- und Organkulturen für die biotechnologische Produktion. Eine Kulturlinie, die schlecht wächst, führt zu niedrigen Ausbeuten, selbst wenn der Gehalt an wertvollen Inhaltsstoffen im Vergleich zu schneller wachsenden Kulturlinien erhöht ist. Nur bei einer Metabolitenbildung, die um einen größeren Faktor erhöht ist als das Wachstum verringert, ist es lohnend, die schlechter wachsende Kultur für die Produktion zu verwenden.

Beim Umsetzen der Haarwurzelkulturen fielen deutliche Unterschiede im Wachstum zwischen verschiedenen Linien auf. Viele Kulturlinien bewuchsen die Platten in drei Wochen sehr dicht, während einige deutlich weniger Biomasse bildeten. Manche Linien (v.a. SO-HSS4a-HR-2) zeigten Längenwachstum, bildeten aber kaum Verzweigungen. Um diese Unterschiede genauer zu erfassen, wurde der in Abschnitt 2.2.6 beschriebene Versuch durchgeführt. Versuchsaufbau und -verlauf illustriert Abbildung 29.

Bei den sechs exemplarisch ausgewählten Linien in Abbildung 29 sind deutliche Unterschiede sowohl im Längenwachstum, als auch bei der Ausbildung von Verzweigungen zu erkennen. Es zeigte sich, dass nach zwölf Tagen bei mehr als der Hälfte der untersuchten Linien eine Längenmessung einiger oder aller Wurzeln nicht mehr möglich war. Aus diesem Grund wurde der Zeitpunkt acht Tage für die Auswertung gewählt.

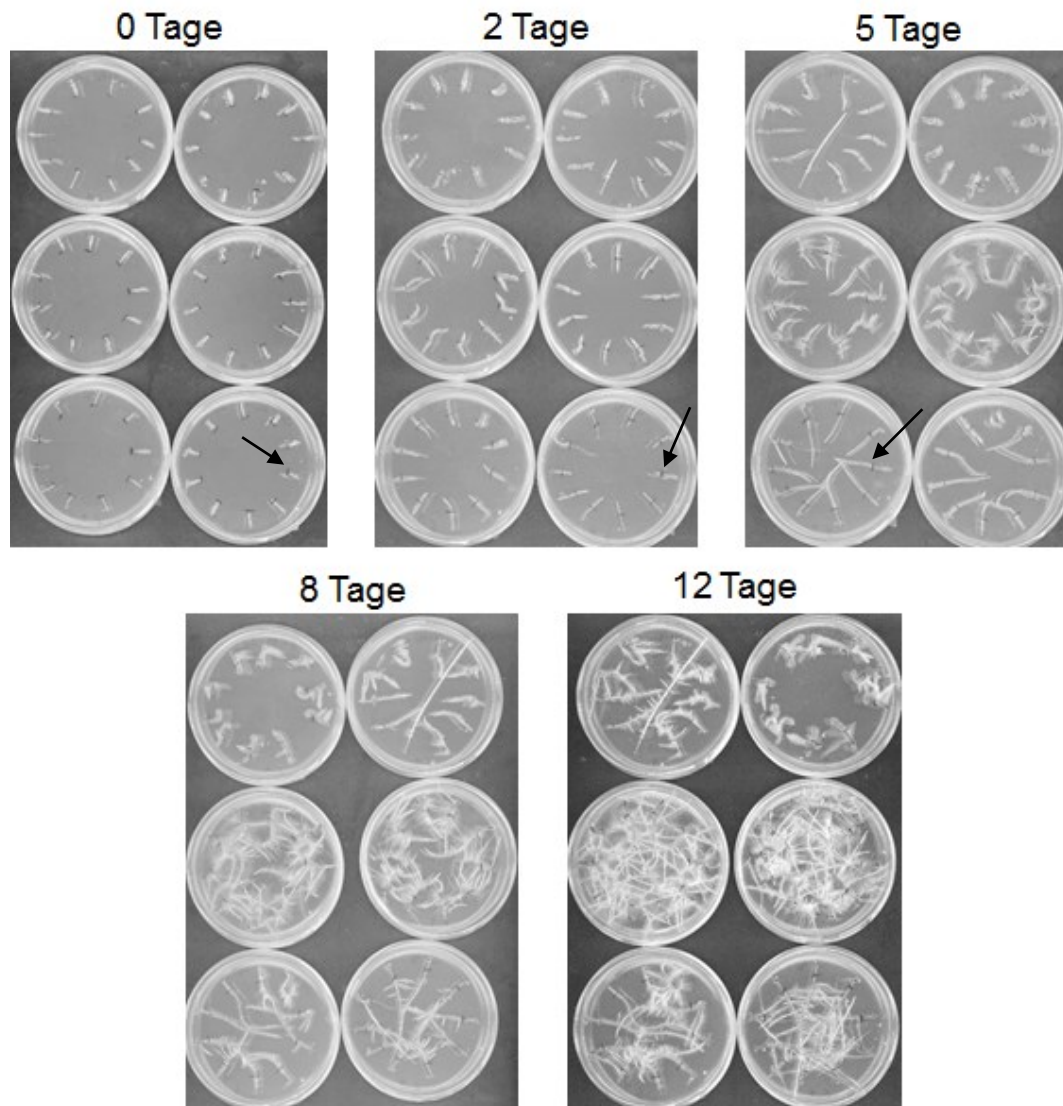


Abbildung 29: Wachstum von Haarwurzelkulturen auf MS-Agar. Dargestellt ist das Wachstum am Beispiel von sechs verschiedenen *S. officinale*-Linien. Direkt nach Versuchsbeginn lagen auf allen Platten je zehn etwa gleich große Wurzelspitzen, deren Endpunkte auf der Rückseite der Petrischale markiert waren (dunkle Striche, Beispiele mit Pfeilen markiert). In den folgenden Tagen zeigen die Kulturlinien unterschiedlich starkes Längenwachstum sowie unterschiedlich frühe und starke Ausbildung von Verzweigungen. Der Durchmesser der Petrischalen betrug 9 cm.

3.1.2.1. Längenwachstum

Alle Wurzelspitzen, die nach acht Tagen noch kein Wachstum zeigten, wurden als abgestorben definiert und aus dem Datensatz entfernt. Aufgrund der Beobachtung, dass gelegentlich einzelne Wurzeln erheblich stärker wuchsen als die anderen auf derselben Platte, wurde beschlossen, diese als Ausreißer nicht in die Auswertung einzubeziehen. Dafür wurden Messwerte, die außerhalb des dreifachen Interquartilsabstands lagen, ausgeschlossen (Tukey 1994). Diese Vorgehensweise führte bei den Datensätzen, bei denen Mittelwert und Median weit

auseinanderlagen, zu einer Annäherung des Mittelwertes an den Median. Letzterer blieb dabei gleich oder erfuhr nur eine geringfügige Änderung.

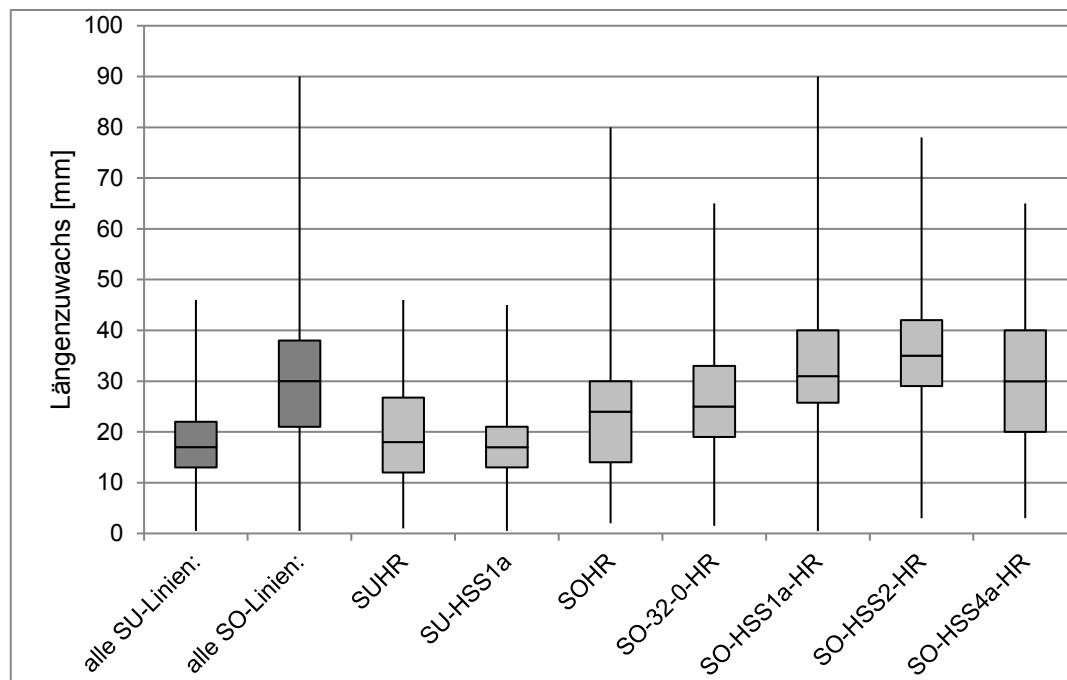


Abbildung 30: Längenzuwachs von Haarwurzeln nach acht Tagen. Dargestellt sind die Daten aus drei unabhängigen Versuchsansätzen als Boxplots. Die Daten der einzelnen Linien wurden gruppenweise (nach Stammpflanze und Konstrukt, siehe Tabelle 15), beziehungsweise nach Stammpflanze (*S. x uplandicum* – SU, *S. officinale* – SO, dunklere Plots links) zusammengefasst. Man erkennt deutliche Unterschiede zwischen SO- und SU-Linien, während die Abweichungen zwischen verschiedenen Gruppen aus der gleichen Stammpflanze erzeugter Linien geringer ausfallen.

In Abbildung 30 sind die Daten aus allen drei Versuchsansätzen, zusammengefaßt nach Gruppen, abgebildet. Einzelne Boxplot-Darstellungen aller untersuchten Linien sind im Anhang zu finden (Abbildung 63 und Abbildung 64). Die in einem Datensatz zusammengefassten *S. x uplandicum*-Linien zeigen ein signifikant ($p < 0,01$) geringeres Längenwachstum als die *S. officinale*-Linien. Der Median liegt bei 17 beziehungsweise 30 mm in acht Tagen, was einer Differenz von 13 mm (43 %, bezogen auf die SOHR-Linien) entspricht.

Unter den *S. x uplandicum*-Linien unterscheidet sich das Längenwachstum der Wildtyp-Kontrollen nach acht Tagen im Median nur um 1 mm (entspricht 5,5 %) von dem der Linien, die das miRNA-Konstrukt 1a tragen. Da dieser geringe Unterschied ohne praktische Relevanz ist, wurde auf die Durchführung eines t-Tests verzichtet.

Die Kontrollen der *S. officinale*-Linien (Gruppen SOHR und SO-32-0-HR, siehe Tabelle 15) wachsen im Median 24 mm in acht Tagen, das sind 8 mm oder 25 % weniger als die Linien, die eines der drei miRNA-Konstrukte tragen (32 mm).

Dieser Unterschied ist signifikant ($p < 0,01$). Wildtyp- und Plasmidkontrollen unterscheiden sich nur um 1 mm (4 %).

3.1.2.2. Seitenwurzelbildung

Nicht nur das Längenwachstum ist von Bedeutung für die Biomasseakkumulation, sondern auch, ob und in welchem Umfang die Wurzeln sich verzweigen und Seitenwurzeln bilden. Beobachtungen beim Umsetzen der Kulturen hatten gezeigt, daß Linien, die sich stark verzweigen, dies schon kurz nach dem Umsetzen auf frisches Medium tun (siehe Abbildung 29; die Wurzelspitzen in der mittleren Reihe sind nach fünf Tagen alle verzweigt und die Platten bei Versuchsende am dichtesten bewachsen). Als Maß dafür, wie schnell und indirekt auch wie stark die verschiedenen Kulturlinien Seitenwurzeln bilden, wurde an den Messtagen auch erfasst, wieviele der Wurzelspitzen mindestens eine Verzweigung gebildet hatten. Der Zeitpunkt der Seitenwurzelbildung ist nur ein schwacher Hinweis auf das Ausmaß. Um dieses korrekt zu erfassen müßte man die Anzahl der primären und, bei den stark wachsenden Linien, auch der sekundären und gegebenenfalls tertiären Verzweigungen bestimmen. Dies war im hier dargestellten Versuchsaufbau nicht möglich, weil die Datenerfassung (bei rund 850 Wurzelspitzen pro Versuchsansatz) sonst mehr als einen Tag pro Messpunkt in Anspruch genommen hätte. Das hätte zu einer Verzerrung der Daten geführt. Die Unterschiede waren nach fünf Tagen am besten erkennbar, sodass in der vorliegenden Arbeit dieser Teil des Datensatzes dargestellt wird. In Abbildung 31 sind die Daten aller drei Versuchsansätze als Mittelwerte der vorgenannten Gruppen und mit der Streuung der einzelnen Linien zusammengefasst. Im Anhang sind Einzeldarstellungen aller vermessenen Kulturlinien zu finden, aufgeschlüsselt nach Versuchsansätzen (Abbildung 65 und Abbildung 66).

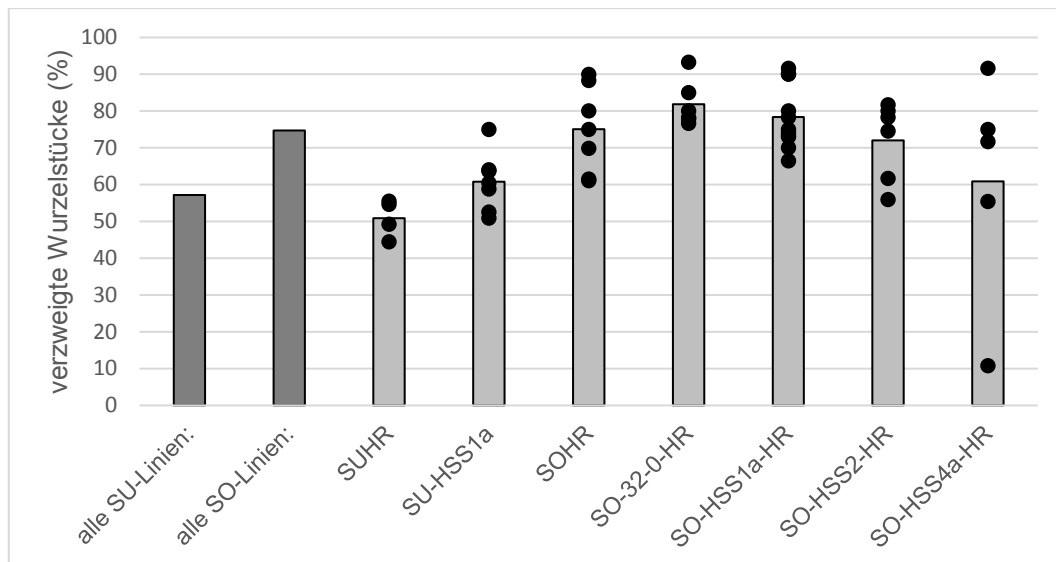


Abbildung 31: Anteil der verzweigten Haarwurzeln nach fünf Tagen. Die Abbildung zeigt, welcher prozentuale Anteil der Wurzelstücken aus allen drei Versuchsansätzen nach fünf Tagen mindestens eine Seitenwurzel gebildet hat. Dabei stellen die grauen Balken die Mittelwerte der jeweiligen Gruppe dar, während die schwarzen Punkte einzelne Linien repräsentieren. Die beiden dunkleren Balken links zeigen den Mittelwert aller *S. x uplandicum*- und *S. officinale*-Linien. Mit wenigen Ausnahmen verzweigen sich die SO-Linien früher als die SU-Linien, erkennbar daran, daß der Anteil der Wurzelspitzen mit Verzweigung nach fünf Tagen größer ist.

Nach fünf Tagen zeigten 57 % der *S. x uplandicum*-Linien Verzweigungen, bei den *S. officinale*-Linien hingegen waren es 75 %. Die SU-Linien wuchsen langsamer und verzweigten sich später als die SO-Linien, was den Eindruck beim Umsetzen nach jeweils drei Wochen bestätigte. Die Medien waren bei SU-Linien stets weniger dicht bewachsen. Exemplarisch zeigt dies auch Abbildung 29 nach 12 Tagen: links oben ist SUHR-1, rechts unten SOHR-14. Aufgrund dieses deutlich schlechteren Wachstums wurde darauf verzichtet, die SU-HSS1a-Linien umfassender zu untersuchen sowie *S. x uplandicum*-Kulturen mit weiteren Konstrukten herzustellen. Die SUHR-Linien wurden dennoch mitgeführt, um eventuelle Unterschiede in der Metabolitenbildung zwischen Haarwurzeln beider Beinwellarten erkennen zu können.

In den fünf Gruppen von *S. officinale*-Kulturlinien weisen im Mittel zwischen 72 und 82 % der Wurzelspitzen nach fünf Tagen Verzweigungen auf. Ausnahme sind die SO-HSS4a-Linien, deren niedrigerer Mittelwert durch SO-HSS4a-1 bedingt ist. Diese ist die einzige untersuchte SO-Linie, bei der nach fünf Tagen weniger als 55 % der Wurzelspitzen verzweigt waren.

3.1.2.3. Biomasseakkumulation

Die Bestimmung der Biomasse nach Anzucht auf Agarplatten ist fehlerbehaftet, da es schwierig ist, Wurzeln und Agar vollständig zu trennen. Es bleibt häufig Agar an den abgezogenen Haarwurzeln hängen, und Haarwurzelstückchen reißen ab und verbleiben auf der Platte. Die jeweiligen Mengen schwanken stark.

Zur Beurteilung des Wachstums findet man in der Literatur zumeist Angaben zur Frischmasse, teilweise auch zur Trockenmasse in Flüssigkultur nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten (Literaturangaben und Vergleichswerte siehe 4.1). Diese Methode wurde für die vorliegende Arbeit in Vorversuchen erprobt, aber verworfen, weil es sich als problematisch erwies, das Medium vor der Bestimmung der Frischmasse aus den dicht verwobenen Wurzelballen zu entfernen. Der dadurch bedingte Fehler ist umso größer, je mehr Biomasse geerntet wird. Die Bestimmung eines Wachstumsfaktors über die Trockenmasse ist ebenfalls ungenau, da der Ausgangswert auf diese Weise nur rechnerisch aus dem Frischgewicht ermittelt werden kann. Die im Vorversuch ermittelten Biomassezuwächse in flüssigem MS-Medium über 14 Tage lagen für die SOHR-Linien bei einer 3,1-fachen bis 8,8-fachen Zunahme, für die meisten Linien zwischen 4 und 8. Die Biomasse von SUHR-1 hatte nach 14 Tagen das 1,1-fache erreicht, die von SUHR-2 das 1,5-fache (jeweils sechs Replikate).

Beim Anziehen von Material in Flüssigkultur für die RNA-Extraktion und Sekundärstoffanalytik (siehe Methoden unter 2.2.5) wurde auch die geerntete Trockenmasse bestimmt. Dazu wurden zunächst je 3 x 90 mg für die RNA-Extraktion gewonnen und das verbleibende Material lyophilisiert und gewogen. Auch hier zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Kulturlinien (Abbildung 32 und Abbildung 33). Die Unterschiede wurden dadurch verstärkt, dass bei einigen Linien weniger Material zum Animpfen zur Verfügung stand (SUHR-1 bis -4, SO-HSS4a-1, 2). Im dritten Versuch wurde für die SUHR-Linien mehr Material angezogen, was sich in den relativ großen Fehlerbalken für diese Linien widerspiegelt (Abbildung 32). Es handelt sich nicht um einen Versuch, der der Bestimmung der Biomasseakkumulation diente, sondern um Nebenergebnisse aus der Anzucht von Material zur Analytik der Sekundärmetabolite. Dennoch können die Daten einen Eindruck über das Wachstumsverhalten geben.

Auffällig ist wieder das relativ schlechtere Wachstum der *S. x uplandicum*-Linien. Doch auch einige SO-HSS-Linien, namentlich SO-HSS2-HR-2 und -5 sowie SO-HSS4a-HR-1 und -2, lieferten im Mittel unter 250 mg Trockenmasse, während die Hälfte der untersuchten Kulturen Mengen über 500 mg erreichte,

SO-HSS1a-HR-1 sogar 960 mg. Von SO-HSS4a-HR-1 konnten nur je 2-3 Mal 90 mg Frischmasse für die RNA-Präparation gesammelt werden. Es verblieb kein Material für die Trocknung und Sekundärstoffanalytik.

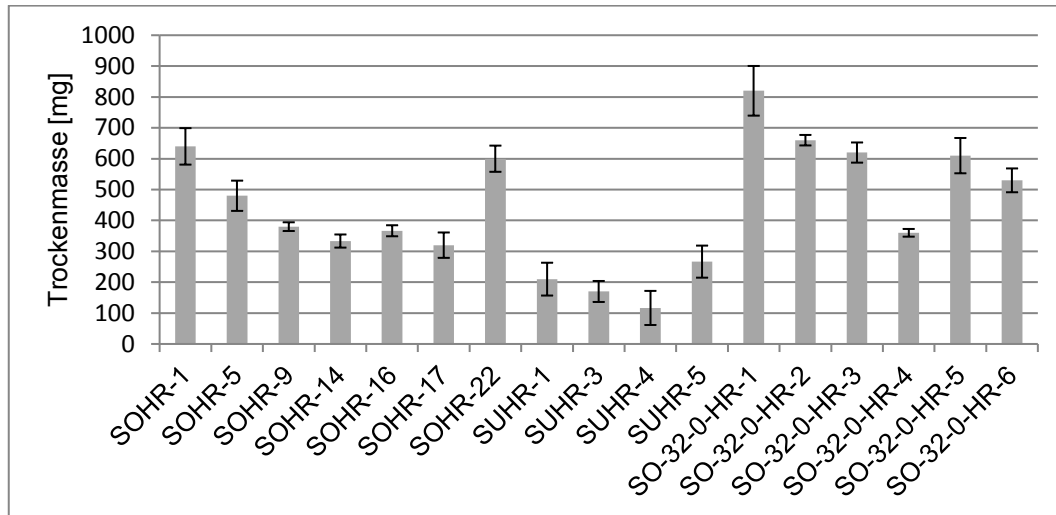


Abbildung 32: Trockenmasse nach 14 Tagen in Flüssigkultur (Kontrollen). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von drei biologischen Replikaten mit dem Standardfehler. SOHR-22 besteht nur aus zwei Replikaten (Ansatz 3 und 4 gingen durch Pilzkontamination verloren). Auffällig ist die geringe Biomasseakkumulation der SUHR-Linien.

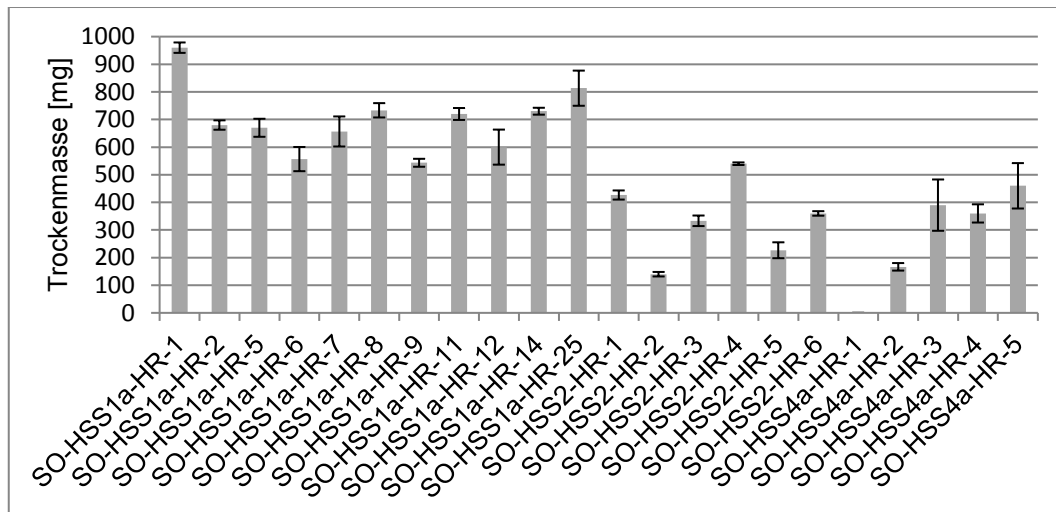


Abbildung 33: Trockenmasse nach 14 Tagen in Flüssigkultur (Linien mit miRNA-Konstrukten). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von drei biologischen Replikaten mit dem Standardfehler. Von den –HSS1a-Linien konnte generell mehr geerntet werden als von den anderen beiden Gruppen, in denen einzelne Linien eine besonders geringe Biomasseakkumulation zeigten. Von SO-HSS4a-HR-1 konnten nur 180 mg Frischmasse geerntet werden.

Daß die SUHR-Linien und einzelne SO-HSS4a-HR-Linien wenig Material lieferten, die SO-HSS1a-HR-Linien hingegen viel, paßt zu den zuvor dargestellten Ergebnissen.

3.2. Bestimmung der Expression von *HSS* und *DHS* mittels qPCR

3.2.1. Methodenetablierung

Zur Etablierung einer Methode zur Bestimmung der Genexpression von *HSS* und *DHS* wurden zunächst, wie im Methodenteil (2.4.3.2) dargestellt, geeignete Primer für diese Gene sowie *Actin* als Referenzgen erstellt und auf Spezifität getestet (siehe 2.4.3.2). Für *Symphytum* sind nur sehr wenige Sequenzen publiziert, darunter während der Erarbeitung der hier beschriebenen Methode keine eines üblichen Referenzgens¹⁶. Zur Herkunft der *Actin*-Teilsequenzen siehe 2.4.3.2.

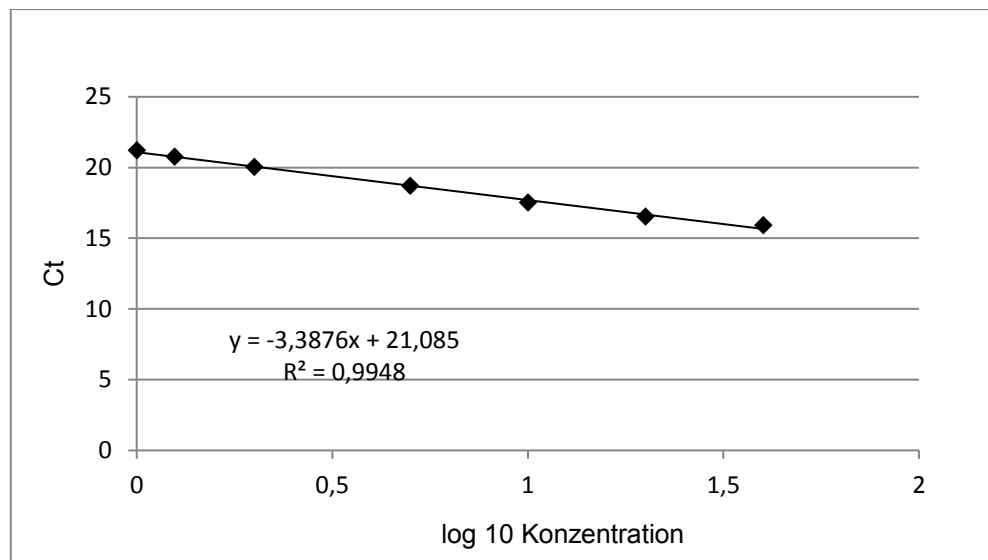


Abbildung 34: Bestimmung der PCR-Effizienz für die q_SO_Actin_201-Primer. Im Diagramm sind die Mittelwerte der Ct-Werte (als Triplikate gemessen) gegen die logarithmierte Konzentration aufgetragen. Dafür wurde die jeweilige Verdünnungsstufe, multipliziert mit dem Faktor 1000 verwendet. Der Anstieg der Regressionsgeraden dient der Berechnung der PCR-Effizienz.

Die Bestimmung der PCR-Effizienz erfolgte über eine Verdünnungsreihe mit acht Schritten von 1:25 bis 1:1000, die aus einer Mischprobe mit gleichen Mengen aller cDNA-Proben des Probensatzes A hergestellt wurde. Die Berechnung der PCR-Effizienz erfolgte nach Dorak (2006). Diese Methode arbeitet mit Konzentrationen, wobei nicht deren absoluter Wert, sondern deren Verhältnis entscheidend für das Ergebnis ist. Um eine übersichtliche Darstellung zu ermöglichen wurden die

¹⁶ Am 18. Oktober 2016, kurz vor Abschluss der praktischen Arbeiten, wurde eine Teilsequenz von *Actin* aus *S. officinale* in GenBank eingetragen.

verwendeten Verdünnungsstufen (1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500, 1:800 und 1:1000) mit dem Faktor 1000¹⁷ multipliziert. Dadurch waren die Werte größer als eins, sodass beim Logarithmieren zur Basis zehn positive Werte erhalten wurden. Diese wurden gegen die Mittelwerte der zugehörigen Ct-Werte aufgetragen. Abbildung 34 zeigt beispielhaft das Diagramm für die *Actin*-Primer. Der Anstieg der resultierenden Regressionsgeraden (m) wurde für die Berechnung der PCR-Effizienz verwendet:

$$E = 10^{-1/m}$$

Dabei entspricht ein Wert von 2 (zwei Kopien pro Zyklus) einer Effizienz von 100 %. Aus $E/2 \cdot 100$ ergibt sich die Effizienz in %. Die so bestimmten PCR-Effizienzen lagen für die Referenzgenprimer q_SO_Actin_201 bei 98,7 %, für die *DHS*-Primer q_SO_DHS_81 bei 99,4 % und für die *HSS*-Primer q_SO_HSS_168 bei 95,6 %. Damit kamen die experimentell ermittelten Effizienzen dem idealen Wert von 100 % sehr nahe. Das lässt darauf schließen, dass die Primer eingesetzt werden können und der Probenpool keine relevanten Mengen von PCR-Hemmstoffen enthielt.

Aufgrund der PCR-Effizienzen von nahe 100 % konnte die vereinfachte Berechnungsmethode zur Ermittlung der relativen Regulation genutzt werden (siehe 2.4.3.3). Die Daten des ersten Probensatzes wurden zunächst nach beiden Varianten der $\Delta\Delta Ct$ -Methode ausgewertet. Dabei bestätigte sich, daß bei der hier verwendeten Methode die Einbeziehung der tatsächlich ermittelten PCR-Effizienzen nur zu geringfügig anderen Ergebnissen führt (Tabelle 16). Diese haben keinen Einfluß auf die Interpretation der Ergebnisse bezüglich der Auf- oder Abregulation des Zielgens. Aus diesem Grund konnte die einfachere Auswerteroutine verwendet werden.

Zur Auswertung der *DHS*-Expression mittels der $\Delta\Delta Ct$ -Methode wurde der Mittelwert aller SOHR-Linien als Kontrolle herangezogen.

Aus den Daten zur Expression von *HSS* ergab sich eine relative Regulation von unter -2 für zwei Linien (SOHR-17 und -22), verglichen mit dem Mittelwert der SOHR-Wildtypkontrollen (siehe Abbildung 35; zum Vergleich mit *DHS* siehe Abbildung 36). Das macht die Verwendung des Mittelwertes oder einer einzelnen Wildtyp-Linie als Kontrolle problematisch. Aus diesem Grund wurde für die Auswertung dieser Daten der Weg über eine absolute Quantifizierung gewählt (siehe Methoden, 2.4.3.4). Zudem ist bei der Darstellung als *HSS*-Kopien pro 1000

¹⁷ Bei Berechnung mit den Verdünnungsstufen (Werte unter 0) entstehen beim Logarithmieren negative Werte, was die Darstellung unübersichtlicher macht. Der resultierende Anstieg, und somit die berechnete PCR-Effizienz, sind gleich.

Actin-Kopien der Vergleich mit den Daten zum PA-Gehalt leichter möglich (3.4). Ein direkter Vergleich mit den Daten der *DHS*-Expression findet nicht statt, weil damit verschiedene, getrennte Fragestellungen behandelt werden. Das erlaubt es, die qPCR-Daten für *HSS* und *DHS* mit verschiedenen Methoden auszuwerten.

Tabelle 16: Berechnete relative Regulation der *DHS*-Expression in Abhängigkeit von der verwendeten Formel. Die Tabelle zeigt beispielhaft Daten aus dem ersten Probensatz, ausgewertet nach der vereinfachten Methode, die von einer PCR-Effizienz von 100 % ausgeht, und unter Einbeziehung der tatsächlichen PCR-Effizienz für die jeweiligen Primer (hier für *Actin* und *DHS*). Die Kontrolle, auf die die Werte bezogen wurden, ist hier SOHR-1. Die Unterschiede, die sich aus den verschiedenen Berechnungsmethoden ergeben, sind sehr klein.

Kulturlinie	relative Regulation (E=100 %)	relative Regulation (effizienzkorrigiert)
SOHR-5	1,84	1,81
SOHR-9	1,49	1,48
SOHR-14	-1,34	-1,33
SOHR-16	1,96	1,94
SOHR-17	1,07	1,07
SOHR-22	1,56	1,55
SO-32-0-HR-1	1,88	1,86
SO-32-0-HR-2	1,28	1,27
SO-32-0-HR-3	1,54	1,53
SO-32-0-HR-4	1,05	1,04

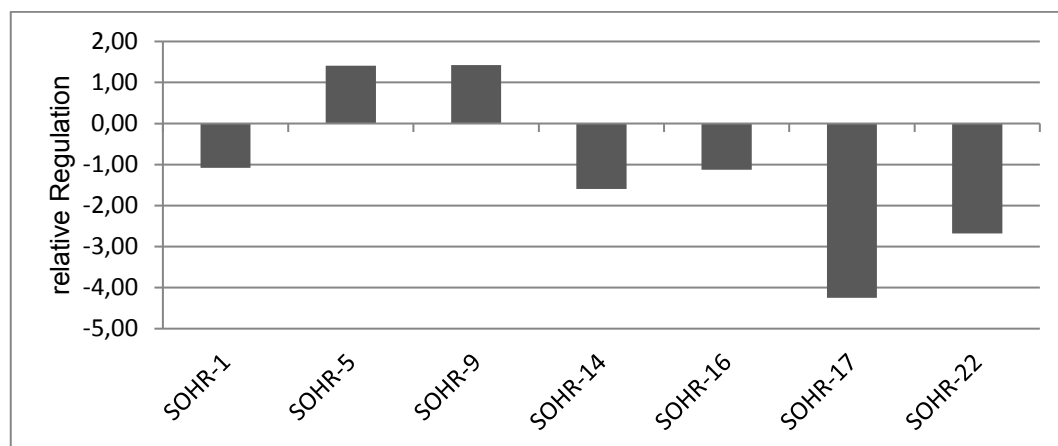


Abbildung 35: Abweichung der *HSS*-Expression vom Mittelwert bei *S. officinale*-Wildtyp-Haarwurzeln. Die Abbildung zeigt die relative Regulation der *HSS*-Expression einzelner Kulturlinien, verglichen mit dem Mittelwert aller Linien. SOHR-17 und SOHR-22 sind, verglichen mit dem Mittelwert, abreguliert.

Die Schmelztemperaturen der Produkte aus cDNA und gDNA-Proben liegen nicht nur für *Actin* (gleiches Produkt), sondern auch für die *HSS*- und *DHS*-Primer trotz unterschiedlicher Produktgrößen jeweils nahe beieinander. Damit sind Produkte

eventuell vorhandener gDNA zwar auf dem Gel, nicht aber in der Schmelzkurve erkennbar. Das macht die Kontrolle der RNA-Proben auf DNA vor dem Umschreiben, die als Teil der Qualitätskontrolle durchgeführt wurde (siehe Abschnitt 2.4.1.3), bei dieser Methode besonders wichtig.

3.2.2. Expression von *HSS* und *DHS* in Haarwurzelkulturen

Für die Untersuchung der Genexpression sowie die Sekundärstoffanalytik wurden alle Kulturlinien mit Ausnahme der Gruppe SU-HSS1a zur Sammlung von Probenmaterial angezogen (siehe Methoden, 2.2.5). Der erste Probensatz (A) wurde vollständig untersucht. Wiederholungsmessungen waren nicht für alle 38 Linien möglich, da von einigen (v. a. den SUHR-Linien) nicht genug Material vorhanden war, sodass von vornherein Mischproben analysiert werden mussten. Zudem wiesen einige Linien sehr ähnliche PA-Gehalte und *HSS*-Mengen auf, weshalb nur für jeweils eine dieser Linien die Probensätze B und C untersucht wurden. Eine detaillierte Beschreibung ist in Abschnitt 3.4 zu finden. Im Folgenden ist zunächst stets der Probensatz A vollständig dargestellt, gefolgt von den Daten der Linien, für die jeweils drei biologische Replikate untersucht wurden.

3.2.2.1. *DHS*

Aufgrund der starken Homologie zwischen dem Zielgen *HSS* und dem Primärstoffwechselgen *DHS* (siehe 1.2.3) musste die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die Expression von *DHS* durch die gegen *HSS* gerichteten Konstrukte beeinträchtigt sein könnte. Um einen solchen unerwünschten Effekt zu erkennen, wurde auch die Expression von *DHS* untersucht.

Wie bereits im Abschnitt 2.4.3.3 dargestellt, gilt eine relative Regulation zwischen 2 und -2, was der doppelten bzw. halben Kopienzahl der Kontrolle entspricht, als nicht reguliert. Als Kontrolle diente hier der ΔC_t aus den Mittelwerten jeweils aller *Actin*- und *DHS*- C_t -Werte der SOHR-Linien (Wildtypkontrollen) des jeweiligen Probensatzes. Abbildung 36 und Abbildung 37 ist zu entnehmen, dass für den Probensatz A kein Wert außerhalb dieser Grenzen lag, die Expression von *DHS* also nicht auffällig schwankte.

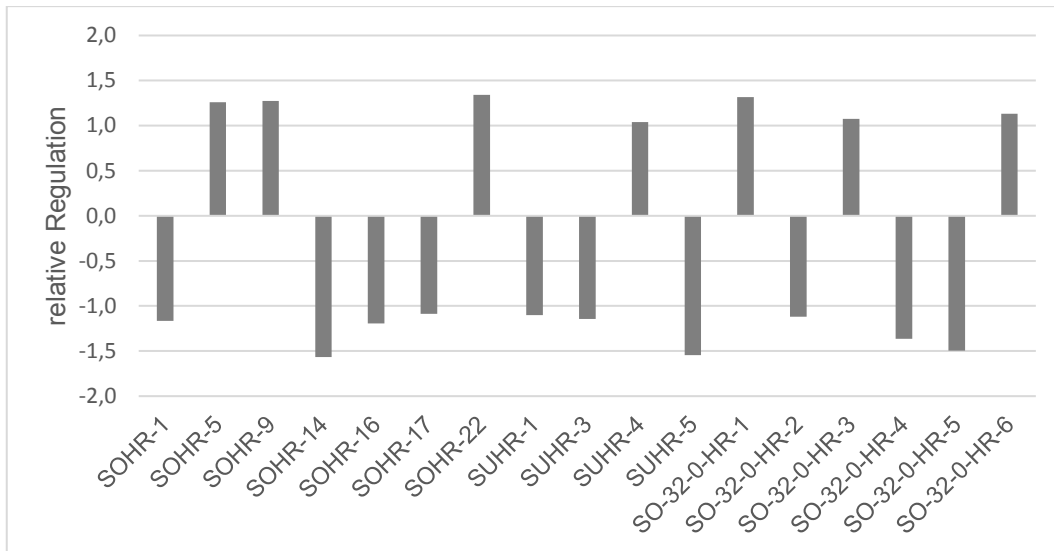


Abbildung 36: Expression von *DHS* im Probensatz A (Kontrollen). Dargestellt ist die Abweichung vom Mittelwert der *S. officinale*-Wildtyp-Kontrollen (SOHR-Linien). Die relative Regulation aller Proben liegt zwischen -2 und 2, es ist also kein Unterschied in der *DHS*-Expression nachweisbar.

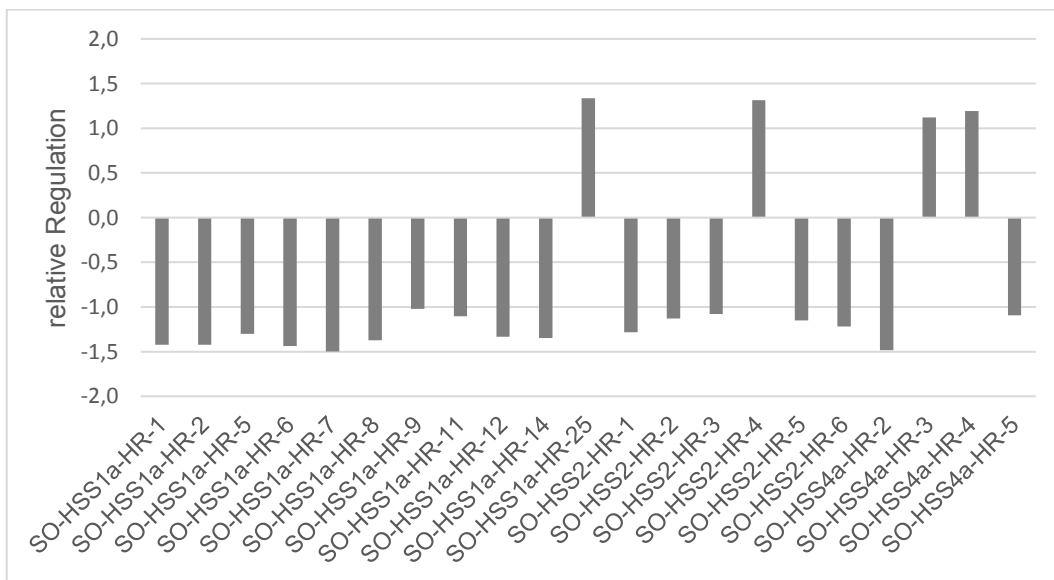


Abbildung 37: Expression von *DHS* im Probensatz A (Linien mit miRNA-Konstrukten). Dargestellt ist die Abweichung vom Mittelwert der *S. officinale*-Wildtyp-Kontrollen (SOHR-Linien). Die relative Regulation aller Proben liegt zwischen -2 und 2, es ist also kein Unterschied in der *DHS*-Expression nachweisbar.

In den Probensätzen B und C zeigten sich bei 22 untersuchten Kulturlinien vier auffällige Werte zwischen 2- und 6-facher Aufregulation (Abbildung 38). Dabei war stets nur eines von drei Replikaten betroffen. Diese Daten zeigen, dass *DHS* mit Ausnahme weniger Auffälligkeiten in den untersuchten Kulturlinien nicht reguliert ist. Somit kann eine Beeinflussung dieses Primärstoffwechsels durch die verwendeten miRNA-Konstrukte ausgeschlossen werden.

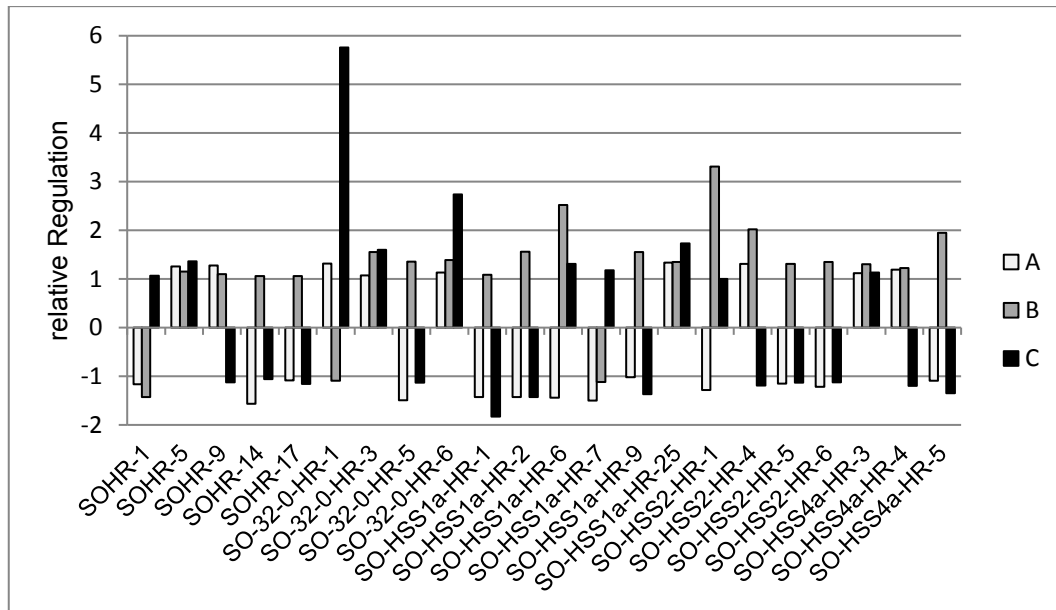


Abbildung 38: Expression von *DHS* in ausgewählten Proben. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse aller drei Probensätze A bis C als Abweichung vom Mittelwert der SOHR-Linien des jeweiligen Probensatzes. Mit Ausnahme von vier Proben zeigte sich auch hier keine Regulation.

3.2.2.2. *HSS*

Wie oben (Methoden, 2.4.3.4) beschrieben, wurde für die Darstellung der *HSS*-Expression die Anzahl der Kopien pro 1000 Kopien *Actin* in der Probe gewählt. In Abbildung 39 ist erkennbar, daß auch die Wildtypkontrollen (SOHR-Linien) in ihrer *HSS*-Expression stark voneinander abweichen. Die Spanne reicht von 12 Kopien / 1000 Kopien *Actin* (SOHR-17) bis 479 (SOHR-9), was nahezu dem 40-fachen entspricht. Dadurch kann weder eine einzelne Linie, noch der Mittelwert der Wildtyplinien als Kontrolle herangezogen werden, wie dies für die Auswertung mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode notwendig wäre. Die natürliche Variation der *HSS*-Expression in Beinwellhaarwurzeln muss bei der Beurteilung der Ergebnisse mit beachtet werden.

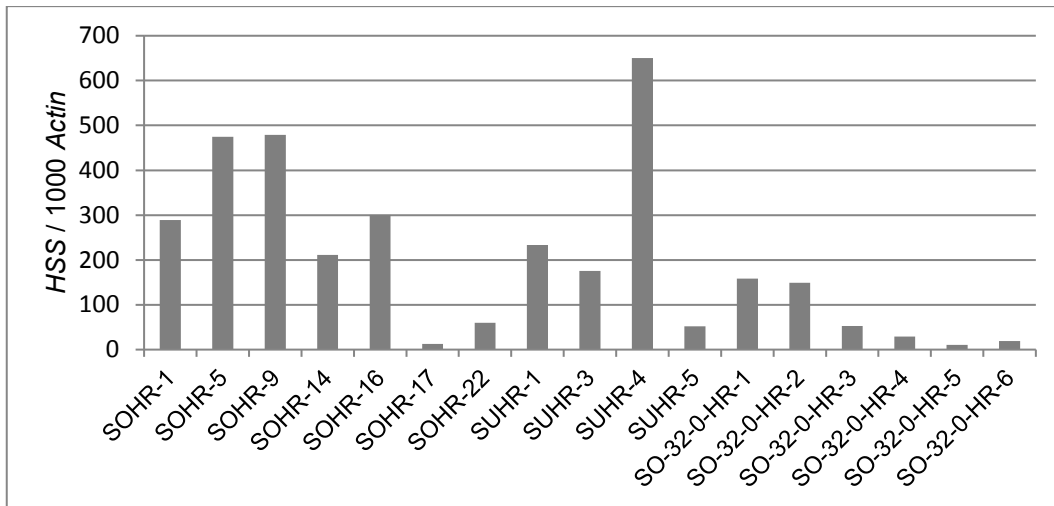


Abbildung 39: Expression von *HSS* im Probensatz A (Kontrollen). Das Diagramm zeigt die Anzahl der *HSS*-Kopien pro 1000 Kopien *Actin*. Auffällig sind die großen Unterschiede zwischen den verschiedenen Wildtyp-Linien.

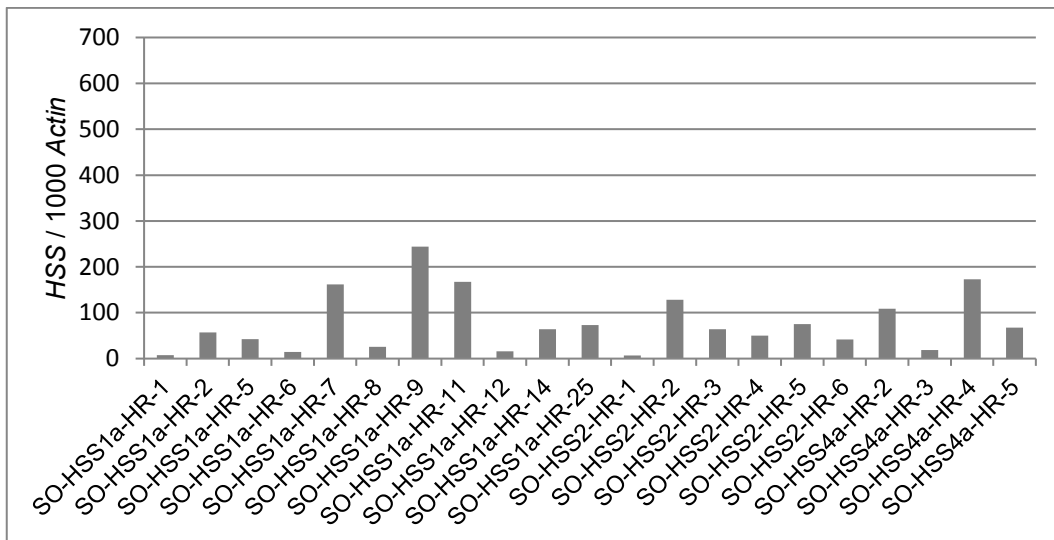


Abbildung 40: Expression von *HSS* im Probensatz A (Linien mit miRNA-Konstrukten). Das Diagramm zeigt die Anzahl der *HSS*-Kopien pro 1000 Kopien *Actin*. Die Expression unterscheidet sich stark zwischen individuellen Linien, fällt aber insgesamt deutlich geringer aus als bei der Mehrzahl der Wildtyp-Kontrollen (vgl. Abbildung 39).

In den mit Wildtyp-Bakterien erzeugten Kulturlinien zeigte sich, mit wenigen Ausnahmen, eine höhere *HSS*-Expression als in jenen, die zusätzliche Transgene tragen. Das gilt nicht nur für die miRNA-Linien (Abbildung 40), sondern auch für die mit dem Kontrollplasmid erzeugten Kulturen (SO-32-0-HR-Linien, Abbildung 39). Die höchste Expression fand sich in SUHR-4, also einer aus *S. x uplandicum* erzeugten Haarwurzellinie. Insgesamt jedoch zeigt sich ein ähnliches Bild in *S. officinale*- und *S. x uplandicum*-Linien, mit jeweils großen individuellen Unterschieden zwischen den einzelnen Linien. Die Mittelwerte der *HSS*-

Expression über die Wildtyp-Linien beider Arten unterscheiden sich nicht (Abbildung 43).

Für die Auswertung der Versuchsreplikate wurden die Daten der drei Probensätze zunächst zu Mittelwerten zusammengefasst (Abbildung 41). Dabei ergaben sich für einige Linien (v.a. SOHR-1 und SO-HSS4a-HR-3) relativ große Standardfehler über die drei Versuchsansätze. Betrachtet man die Probensätze einzeln (Abbildung 42) so fällt auf, dass für diese deutliche Abweichung stets eine der drei Proben verantwortlich ist (bei SOHR-1 Probe C, bei SO-HSS4a-HR-3 Probe A), während die beiden anderen näher beieinanderliegen. Keiner der drei Probensätze liefert generell die höchsten oder die niedrigsten Werte, was gegen einen systematischen Fehler aus der Versuchsdurchführung spricht.

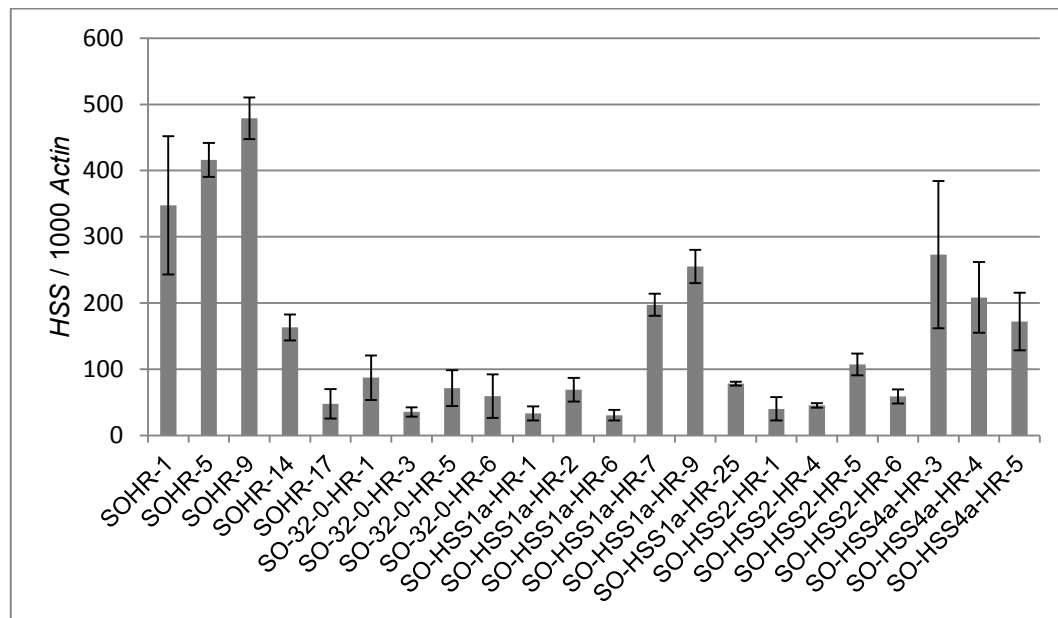


Abbildung 41: Expression von HSS in ausgewählten Proben (Mittelwerte). Dargestellt sind die Mittelwerte von drei biologischen Replikaten (A bis C) und der Standardfehler. Man erkennt deutliche individuelle Unterschiede zwischen den Linien und teilweise große Fehlerbalken, die für starke Schwankungen zwischen den Versuchsansätzen sprechen.

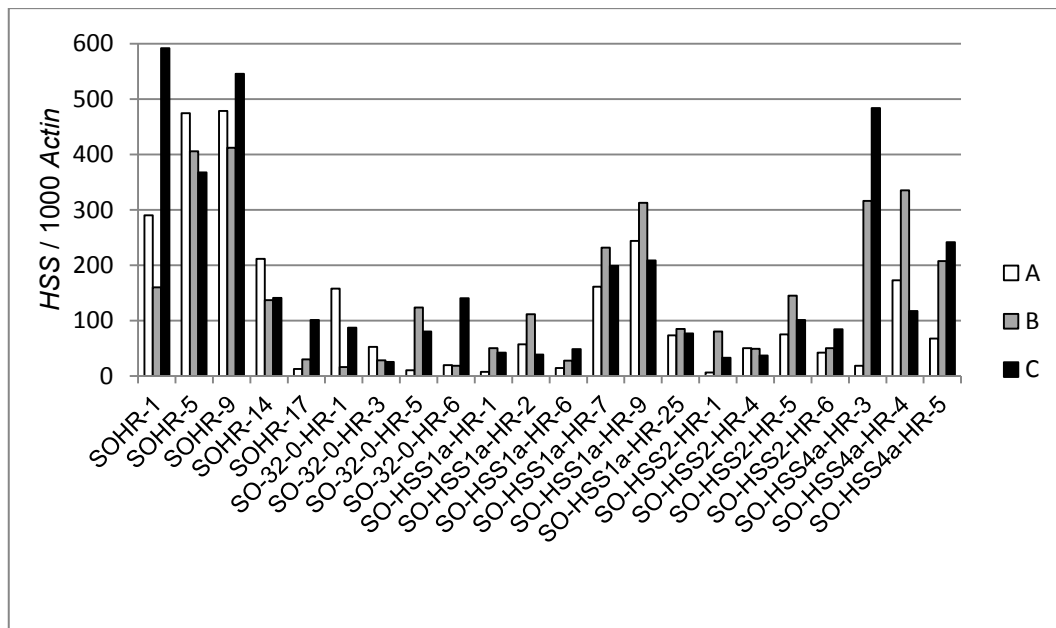


Abbildung 42: Expression von *HSS* in ausgewählten Proben (einzelne Replikate). Für jede Linie sind die Einzelwerte der Proben A bis C dargestellt. Keiner der drei Versuchsansätze ergab durchgehend die höchsten oder die niedrigsten Werte.

Um einschätzen zu können, ob sich trotz der großen individuellen Unterschiede in der *HSS*-Expression auch Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen zeigen, wurden jeweils alle vorliegenden Daten zusammengefasst und statistisch ausgewertet (Abbildung 43).

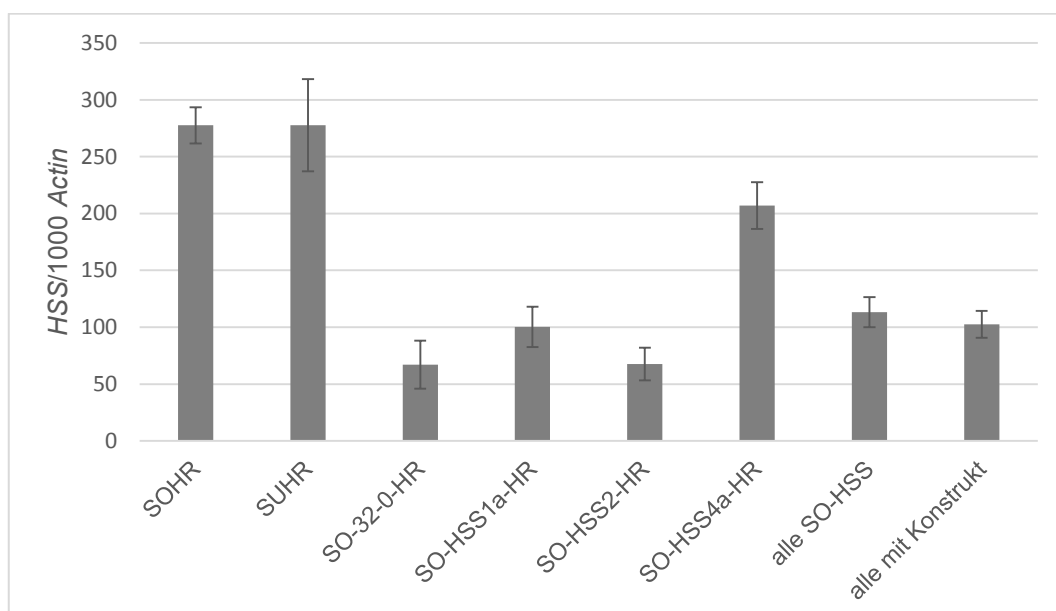


Abbildung 43: Expression von *HSS* nach Gruppen von Kulturlinien. Es wurden Daten aus allen drei Versuchsansätzen verwendet. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und der Standardfehler. Für SUHR waren nur vier Werte vorhanden, bei allen anderen Gruppen ist $n > 10$.

Die verschiedenen Gruppen wurden mit einem zweiseitigen ungepaarten t-Test miteinander verglichen ($\alpha=0,05$). Dabei bestätigte sich, daß sich die Kontrollen mit leerem Plasmid (SO-32-0-HR) und die Haarwurzeln mit den miRNA-Konstrukten -HSS1a und -HSS2 signifikant von den Wildtyp-Linien, nicht jedoch untereinander unterschieden. Auffällig ist die Gruppe von Kulturlinien mit -HSS4a, die sich signifikant von den übrigen Gruppen mit artifizieller DNA, nicht jedoch von den Wildtyplinien SOHR unterscheiden.

3.3. Analytik von Sekundärmetaboliten

3.3.1. Bestimmung des Allantoingehalts

3.3.1.1. Methodenoptimierung

Die Kalibrierung der HPLC-Methode zur Allantoinbestimmung wurde in Abschnitt 2.5.1.2 dargestellt.

Nach Einbau einer neuen HPLC-Trennsäule eluiert Allantoin zunächst nach rund neun Minuten. Diese Zeit verkürzt sich erst rasch, dann langsamer und stabilisiert sich schließlich bei 5,2 Minuten (Abbildung 44). Bei anderen markanten Peaks in den untersuchten Extrakten wurde dieses Phänomen nicht beobachtet. Die Ursache dieses Effekts konnte nicht geklärt werden. Um die aktuelle Retentionszeit von Allantoin sicher zu bestimmen wurde in jeder Meßreihe mehrfach ein Allantoinstandard injiziert. Bei Coelution von Allantoin mit anderen Substanzen wurde die betreffende Probe zurückgestellt und später erneut vermessen.

Aus den sich verändernden Positionen des Allantoinpeaks im Chromatogramm ergab sich das Problem, dass Überlagerungen mit kleineren Peaks anderer Substanzen schwer ausgeschlossen werden konnten und immer wieder neu anhand älterer Chromatogramme ähnlicher Proben und der Peakform geschlossen werden mußte, ob eine ausreichende Trennung vorlag. Aufgrund dieser Unsicherheiten wurden Allantoinpeaks < 15 Flächeneinheiten (kAm) nicht quantitativ ausgewertet, da hier unerkannte Überlagerungen mit sehr kleinen weiteren Peaks zu besonders großen Fehlern geführt hätten. Daraus ergibt sich für Allantoin eine Bestimmungsgrenze von 2,5-3 mg/g Trockenmasse (abhängig von der Einwaage). Zudem wurde, zusätzlich zum in jedem Messlauf mitgeführten externen Standard, mindestens halbjährlich oder nach Einbau einer neuen Säule anhand frischer Kalibrierlösungen geprüft, ob die damit gemessenen Flächen noch

mit der Kalibrierung übereinstimmten. Dabei erwies sich das Verhältnis von Peakfläche und Konzentration als sehr stabil.

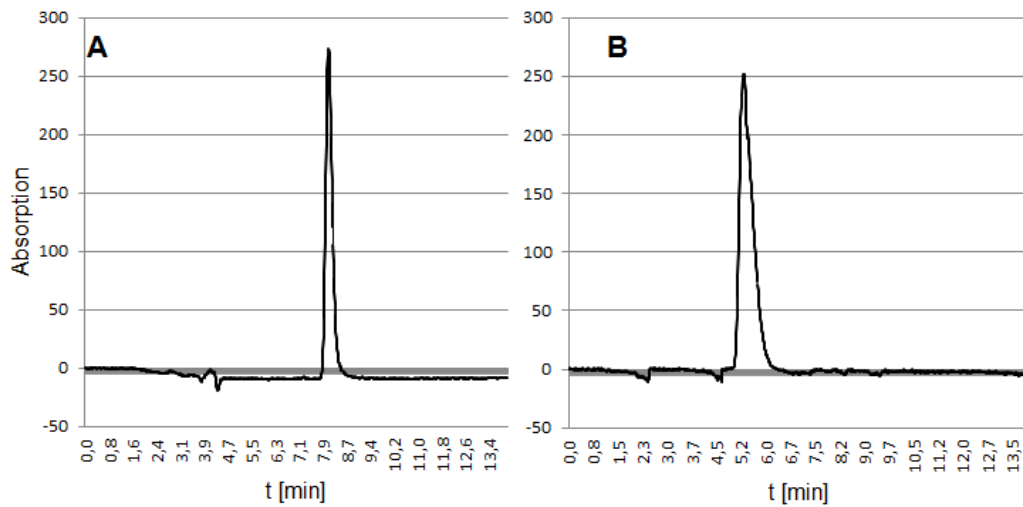


Abbildung 44: Retentionszeit von Allantoin. Dargestellt sind die resultierenden Chromatogramme nach Injektion einer Allantoinlösung kurz nach Einbau einer neuen Säule (A) und nach mehrwöchigem Gebrauch (B).

In Abbildung 45 und Abbildung 46 sind Chromatogramme der Speicherwurzeln und von Haarwurzelkulturen dargestellt. Allantoin eluierte bei diesen Messungen nach 6 Minuten und ergab einen gut erkennbaren Peak. Anhand des Chromatogramms der Haarwurzeln (Abbildung 46) ist auch die Problematik der Überlagerung mit kleineren Peaks gut erkennbar, aufgrund derer kleine Flächen nicht quantitativ ausgewertet wurden (siehe vorheriger Absatz). Weitere typische Chromatogramme von Extrakten verschiedener Pflanzenorgane und *in vitro*-Kulturen sind im Anhang zu finden (Abbildung 67 bis Abbildung 72).

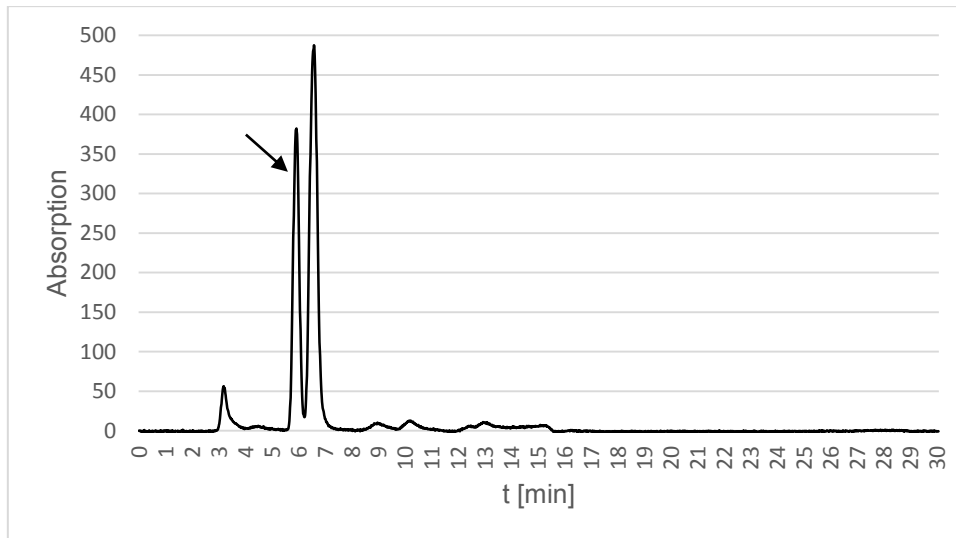


Abbildung 45: Chromatogramm des Extrakts dicker, > 1 Jahr alter Wurzeln von *S. officinale*. Allantoin eluierte hier nach 5,9 min, was zum ersten der beiden prominenten Peaks passt (Pfeil).

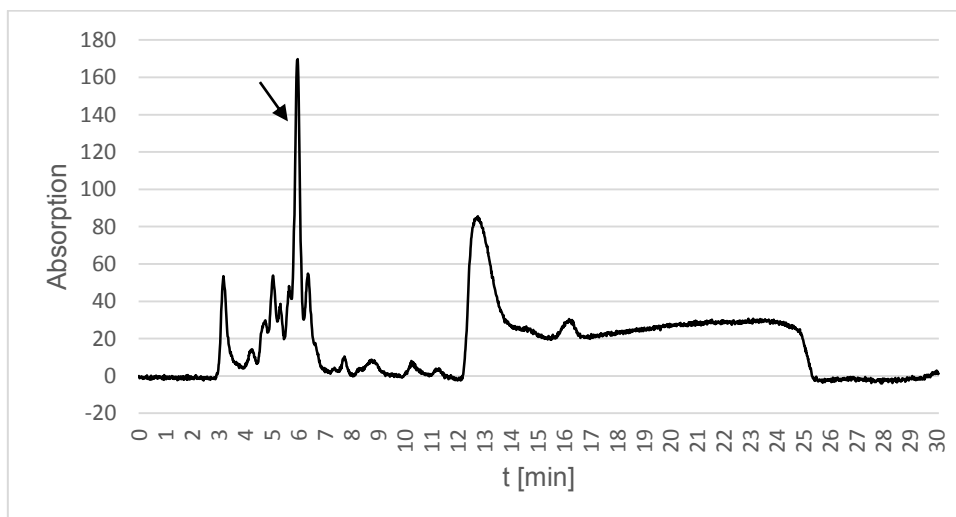


Abbildung 46: Chromatogramm eines Extrakts von *S. officinale* Haarwurzeln. Allantoin eluierte nach 6 min (selbe Messreihe wie Abbildung 69).

3.3.1.2. Optimierung der Extraktion

Beim Vergleich verschiedener Extraktionszeiten zwischen zwei und sechs Stunden zeigten sich nur geringe Unterschiede, die nicht in Beziehung zur Extraktionszeit standen (Abbildung 47). Folglich wurde für die Proben aus den Versuchen eine Extraktionszeit von zwei Stunden gewählt. Die geringen Abweichungen innerhalb der Messreihen trotz unterschiedlicher Extraktionszeiten lassen auf eine hohe Robustheit der Methode schließen.

Ebenso wurde die Extraktion bei Raumtemperatur und bei 50°C verglichen. Auch hier war kein Unterschied erkennbar, sodass bei Raumtemperatur gearbeitet werden konnte.

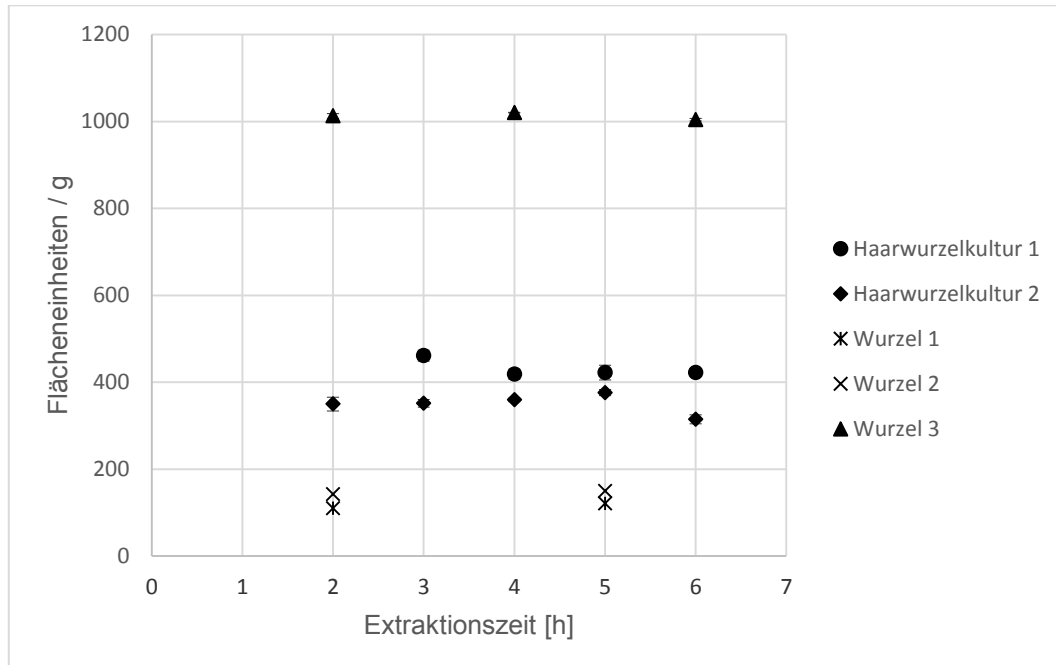


Abbildung 47: Peakfläche in Abhängigkeit von der Extraktionszeit. Dargestellt sind fünf Messreihen, für die jeweils homogenisiertes gefriergetrocknetes Probenmaterial aufgeteilt und über verschiedene Zeiten von 2 bis 6 Stunden extrahiert wurde. Die Peakflächen wurden jeweils um die Einwaage korrigiert. Der Standardfehler von Wiederholungsmessungen und technischen Replikaten (Messreihe Haarwurzelkultur 1) lag im Bereich von 0,2 bis 2,8 %.

3.3.1.3. Allantoingehalt in verschiedenen *Symphytum*-Proben

Da nur jeweils eine Probe gemessen wurde (mit einer Mischung von Material mehrerer Pflanzen) ist keine Aussage zu Gehaltsschwankungen zwischen verschiedenen Pflanzen zum selben Zeitpunkt möglich. Die Ergebnisse sind somit nur als Trend zu verstehen.

Die Messung des Allantoingehalts in verschiedenen Pflanzenorganen zeigte in beiden untersuchten Kultivaren eine sehr heterogene Verteilung (Abbildung 48). *S. officinale* akkumuliert Allantoin hauptsächlich in den Wurzeln. Dabei zeigte sich, dass vor allem in den unter einjährigen Wurzeln der Gehalt stark von der Jahreszeit abhängt. In den hier untersuchten Proben wurde im März die siebenfache Menge gemessen, verglichen mit den Proben aus dem Juli desselben Jahres. Bei älteren Wurzeln und jungen Blättern ist der gleiche Trend erkennbar.

S. x uplandicum zeigt in den Wurzeln ähnliche Gehalte an Allantoin wie *S. officinale*. Auch hier ist im Frühjahr der Gehalt höher als im Sommer. Auffällig

ist allerdings, daß diese Kreuzung vor allem im Sommer größere Mengen Allantoin in den Blättern enthält.

Ausgewachsene Blätter (>15 cm bei *S. officinale*, >10 cm bei *S. x uplandicum*, siehe auch 2.2.5) enthalten generell sehr wenig Allantoin.

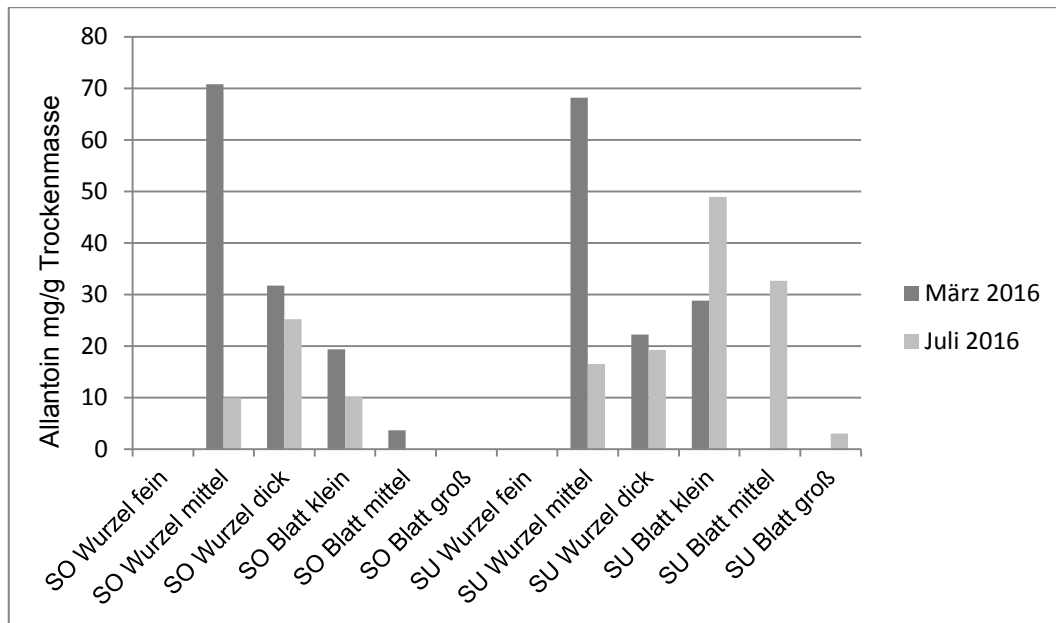


Abbildung 48: Allantoingehalt in Beinwellpflanzen. Dargestellt ist der Allantoingehalt in Mischproben aus Material von jeweils 2-3 Pflanzen, jedoch nur einer Messung pro Balken. In den Proben, für die kein Balken dargestellt ist, konnten nur Spuren von Allantoin detektiert werden. SO – *Symphytum officinale*, SU – *Symphytum x uplandicum*

Der Allantoingehalt von Haarwurzelkulturen bewegt sich zwischen 10 und 20 mg/g Trockenmasse und liegt damit im gleichen Bereich wie in den untersuchten Wurzelproben aus dem Sommer und junge Blätter von *S. officinale*. Dabei war kein Unterschied zwischen den Kontrollen, die mit Wildtyp-Agrobakterien erzeugt wurden oder T-DNA mit Vektorbestandteilen enthielten, und den Linien mit miRNA-Konstrukten zu erkennen (Abbildung 49 und Abbildung 50).

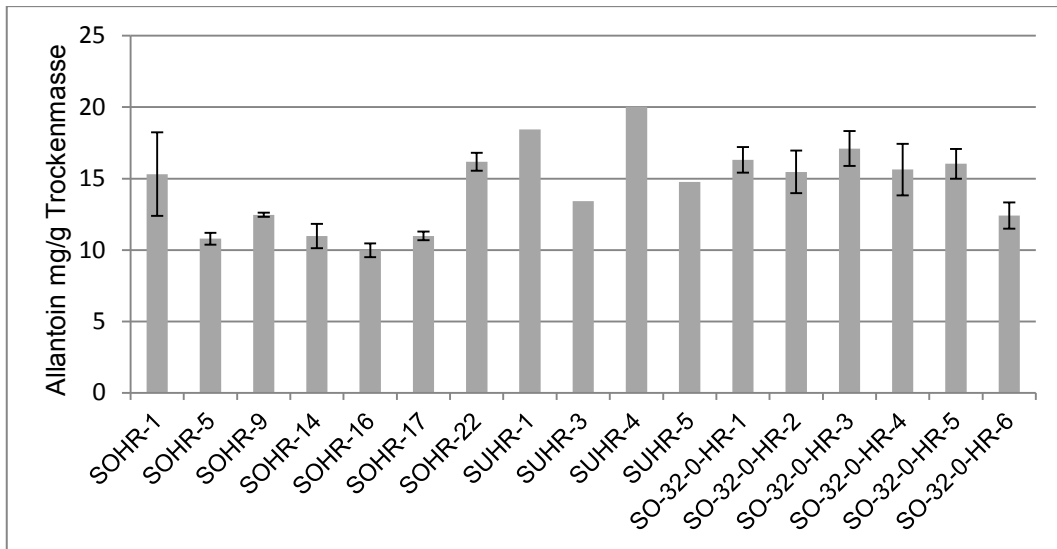


Abbildung 49: Allantoingehalt in Haarwurzeln (Kontrollen). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen biologischen Replikaten mit dem Standardfehler. Von den vier Linien ohne Fehlerbalken konnte nicht genug Material geerntet werden, sodass die drei Proben gemischt und jeweils die Mischungen untersucht wurden.

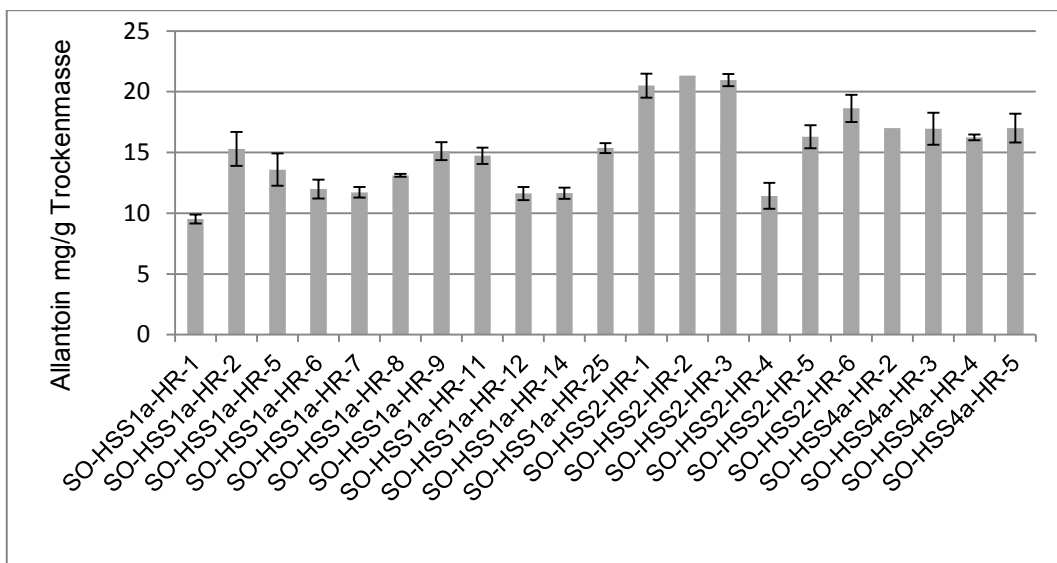


Abbildung 50: Allantoingehalt in Haarwurzeln (Linien mit miRNA-Konstrukten). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen biologischen Replikaten mit dem Standardfehler. Von den zwei Linien ohne Fehlerbalken konnte nicht genug Material geerntet werden, sodass die drei Proben gemischt und jeweils die Mischungen untersucht wurden.

Da einige Linien, hauptsächlich von *S. x uplandicum* (SUHR-Linien), ein sehr langsames Wachstum und geringe Biomasseakkumulation zeigten, wurden diese in einem weiteren Versuch über drei Wochen in Flüssigmedium kultiviert (Abbildung 51). Als Kontrolle wurde die schnell wachsende Linie SOHR-1 mitgeführt. Ein gepaarter zweiseitiger T-Test mit den Mittelwerten der Proben aller Linien jeweils über zwei und drei Wochen ergab keinen signifikanten Unterschied.

Der Allantoingehalt wird nicht oder nur geringfügig von der Kultivierungsdauer beeinflusst.

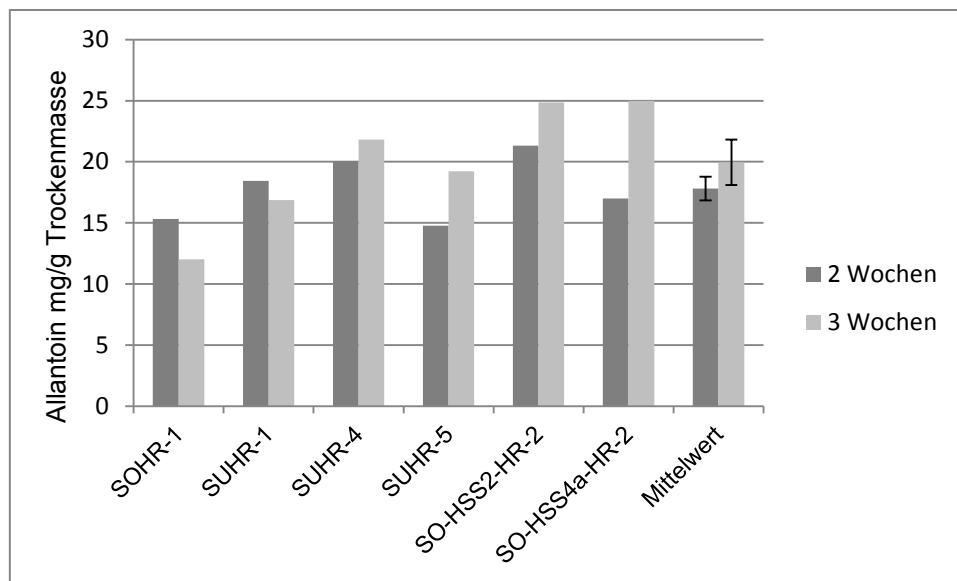


Abbildung 51: Allantoingehalt in Haarwurzeln in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Es wurde je einem Ansatz pro Linie und Bedingung kultiviert. Der Mittelwert fasst alle zuvor dargestellten Einzelmessungen zusammen. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler.

Im Licht kultivierter Kallus enthielt im Mittel 5,2 mg/g Allantoin. In einer der drei Proben des im Dunkeln angezogenen Kallus konnten nur 3,3 mg/g gemessen werden. Die beiden anderen Proben enthielten Allantoin unterhalb der Bestimmungsgrenze (< 3 mg/g).

Allantoin wird nicht in nachweisbaren Mengen in das Kulturmedium von Haarwurzeln abgegeben.

Vergleicht man den Allantoingehalt mit den Daten zu Längenwachstum und Erntemasse, so zeigt sich eine schwache Tendenz zu höheren Allantoingehalten bei schwächer wachsenden Linien. Allerdings gibt es auch Ausnahmen. Zudem wird der niedrigere Gehalt oft durch die stärkere Biomasseproduktion mehr als ausgeglichen, sodass sich eine höhere Gesamtausbeute ergibt. Eine Übersicht gibt Tabelle 17.

Tabelle 17: Erntemasse und Allantoingehalt in ausgewählten Haarwurzellinien. Die Tabelle zeigt beispielhaft den Zusammenhang zwischen Biomasseproduktion, Allantoingehalt und Gesamtausbeute. Viele Linien zeigen wie die hier dargestellten SO-HSS-Linien einen höheren Allantoingehalt bei geringerer Biomasseproduktion. Einige jedoch, wie die beiden SOHR-Linien, folgen diesem Trend nicht. Die Gesamtausbeute wird zumeist stärker von der Biomasseproduktion als vom Allantoingehalt bestimmt, da hier die Unterschiede größer sind. Alle Angaben beziehen sich auf die Trockenmasse.

Linie	Erntemasse [mg]	Allantoingehalt [mg/g]	Gesamtmenge Allantoin [mg]
SOHR-1	640	15,3	9,8
SOHR-16	367	10,0	3,7
SO-HSS1a-HR-1	960	9,5	9,1
SO-HSS1a-HR-2	680	15,3	10,4
SO-HSS2-HR-1	427	20,5	8,5
SO-HSS2-HR-2	140	21,3	3,0
SO-HSS2-HR-4	540	11,4	6,2
SO-HSS2-HR-6	360	18,6	6,7

3.3.2. Bestimmung des Pyrrolizidinalkaloidgehalts

3.3.2.1. Methodenoptimierung

Die Kalibrierung der Bestimmung des Gesamt-PA-Gehalts mit GC-MS ist unter Methoden (2.5.2.1) dargestellt.

Abbildung 52 zeigt ein Chromatogramm der reduzierten Monocrotalin / Heliotrin-Mischung. Die beiden Necinbasen eluierten nach 15,4 und 16,0 Minuten als vollständig getrennte Peaks. Welche Substanzen zu den anderen im Chromatogramm sichtbaren Peaks führen, ist nicht bekannt. Wahrscheinlich handelt es sich um Nebenprodukte oder Verunreinigungen aus der Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid. Nur die Peaks der beiden Necinbasen zeigen das typische Massenspektrum (Abbildung 53).

Beispiele für Chromatogramme der verschiedenen Extrakte aus Pflanzenorganen und Zellkulturen sind im Anhang (Abbildung 73 bis Abbildung 82) zu finden.

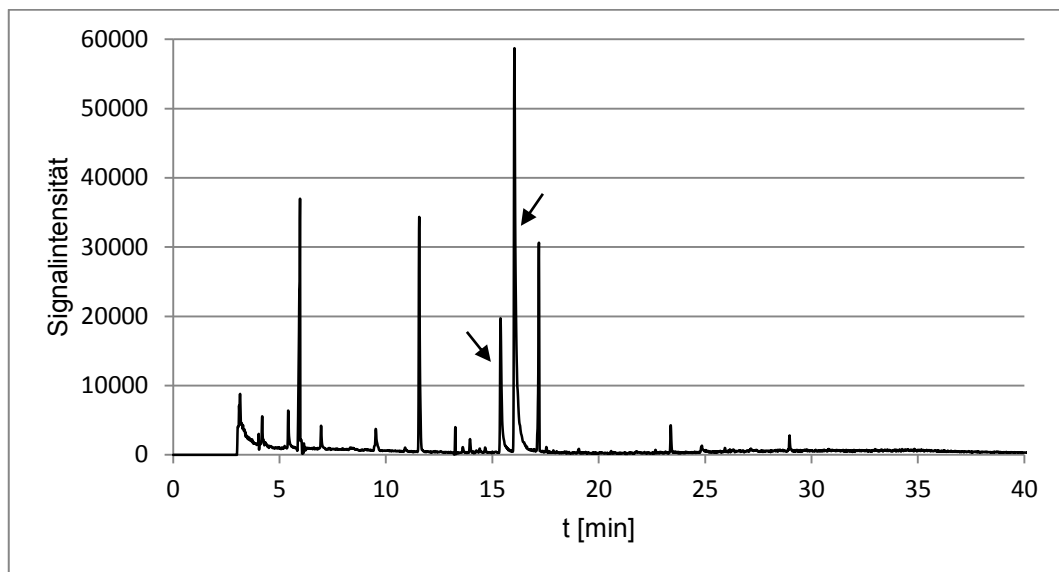


Abbildung 52: Chromatogramm der PA-Standards. Die Probe enthielt eine Mischung aus 1 µg Monocrotalin und 5 µg Heliotrin. Nach der Reduktion zu den Necinbasen und Silylierung wurde 1 µl (von 100) injiziert. Retronecin (aus Monocrotalin) eluierte nach 15,4 min, Heliotridin (aus Heliotrin) nach 16,0 min (Pfeile). Nur diese beiden Peaks zeigen das typische Massenspektrum.

Wichtig für die Identifizierung der richtigen Peaks und deren Auswertung ist die Überprüfung des Massenspektrums, in dem die drei typischen Massenpeaks bei Masse-/Ladungsverhältnissen von 98, 183 und 299 erkennbar sein sollten (Abbildung 53). Es zeigte sich im Verlauf der Arbeiten, dass Verstärkung des 299er Peaks auf über 50 % der Intensität des gewöhnlich höchsten 93er Peaks auf eine Überladung hindeutet. Bei stark überladenen Proben wird das Ion so prominent, dass die anderen Peaks im Massenspektrum nahezu verschwinden (Abbildung 54). Wenn diese Effekte auftraten, wurde die betreffende Probe verdünnt und erneut vermessen.

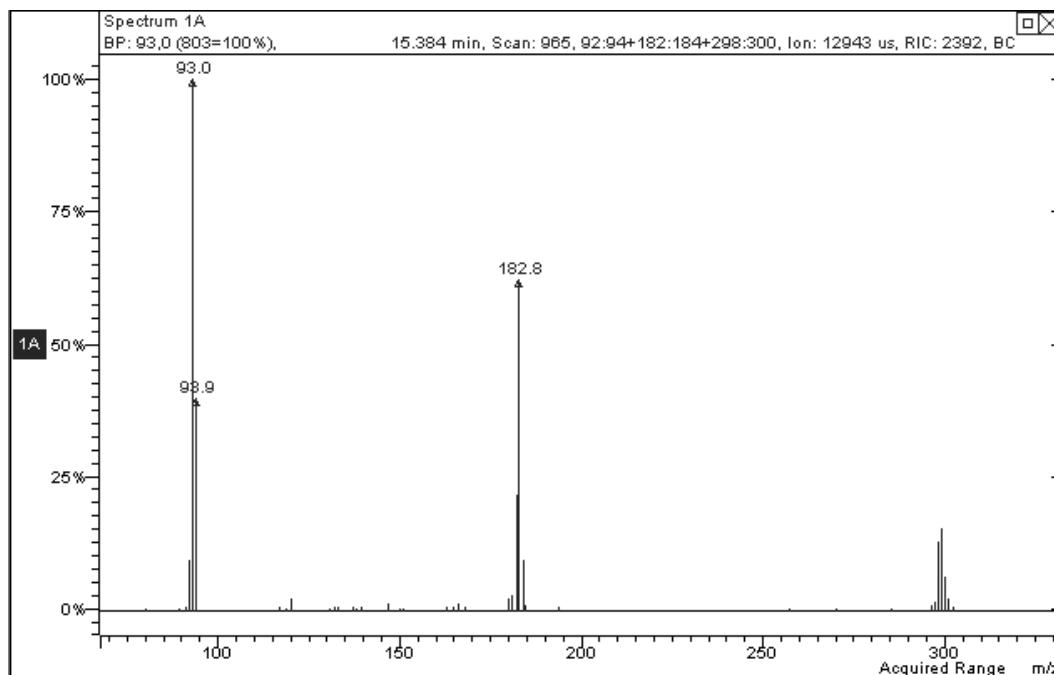


Abbildung 53: Massenspektrum Retronecin / Heliotridin (im Messbereich). Deutlich sichtbar sind die typischen drei Massenpeaks bei 93, 183 und 299. Die größte Masse sollte 50% nicht überschreiten.

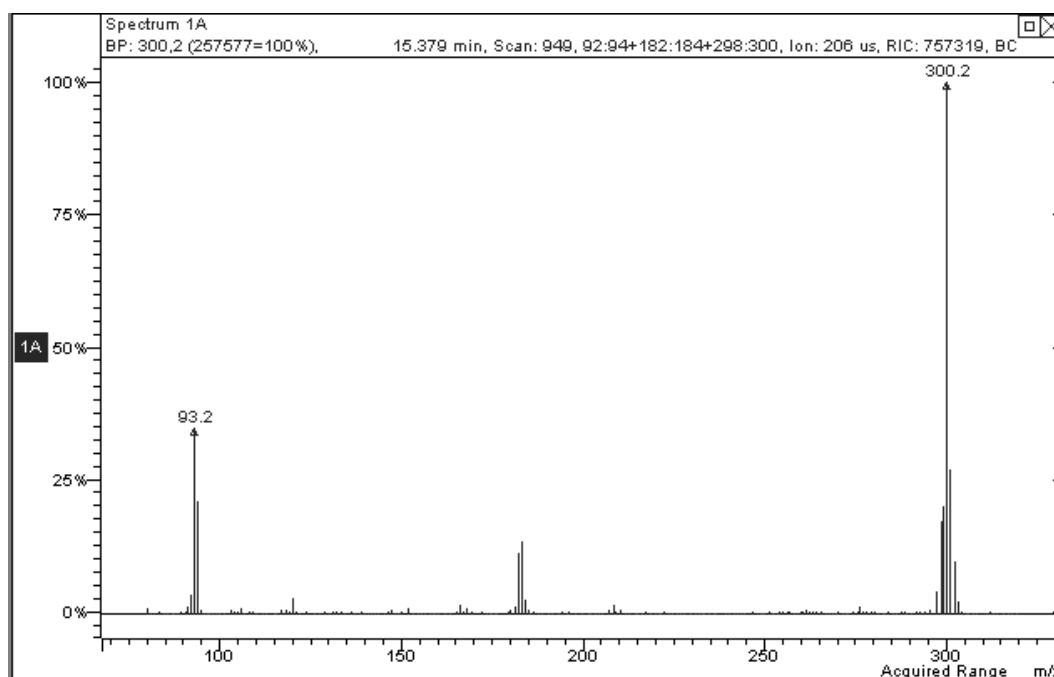


Abbildung 54: Massenspektrum Retronecin / Heliotridin (überladen). Die typischen drei Massenpeaks (93, 183 und 299) sind erkennbar, allerdings sind die Verhältnisse der Intensitäten stark verschoben. Der größte Anteil des Signals entfällt auf das Ion 299.

Um ein Überschätzen der Standardmenge durch eventuell in der Probe vorhandene PA vom Heliotridin-Typ auszuschließen (siehe 1.2.1) wurden beispielhaft Proben aller zu untersuchenden Organe und Gewebe (Blätter und

Wurzeln verschiedener Entwicklungsstadien, Haarwurzeln und Kallus) geteilt und nur einem der beiden Replikate Heliotrin zugesetzt. Die Proben ohne Standard wurden ebenfalls nach Protokoll derivatisiert und analysiert. Trotz guter Ausbeuten (erkennbar am Retronecin-PA-Gehalt im Vergleich zur mit Standard analysierten Probe) konnte in keiner der Proben ohne Heliotrinzusatz Heliotridin nachgewiesen werden. Das bestätigt die Literatur (Wuilloud et al. 2004), laut der das Vorkommen Heliotridin-Typ-PA in Beinwell unwahrscheinlich war.

3.3.2.2. Auswahl der Proben für Wiederholungsmessungen

Nach Messung von Genexpression, Allantoin- und Alkaloidgehalt für den vollständigen Probensatz A sowie die Mischproben der Linien, die zu wenig Biomasse für eine einzelne Analyse geliefert hatten, wurden einige Linien aus der Untersuchung der Probensätze B und C ausgeschlossen. Dabei handelte es sich um jene Linien, von denen zu wenig Material für Einzelanalysen vorhanden war (SUHR-1, 3, 4, 5; SO-HSS2-HR-2; SO-HSS4a-HR-2) sowie um SOHR-22, bei der die C-Probe aufgrund von Pilzbefall fehlte. Diese Linien wiesen neben einer niedrigen Trockenmasse bei der Ernte auch ein geringeres Wachstum auf Agarplatten auf, mit Ausnahme von SO-HSS2-HR-2, deren Längenwachstum und Verzweigungsrate im mittleren Bereich lagen (siehe 3.1.2).

Zudem wurde, wenn mehrere Linien in einer Gruppe ähnliche Expressionsdaten (Abbildung 39, Abbildung 40) und PA-Gehalte (Abbildung 56, Abbildung 57) zeigten, nur ein Teil dieser Linien für die Analyse der Replikate ausgewählt. So wurde SOHR-16 ausgeschlossen, weil sie SOHR-14 ähnelte (*HSS*-Kopien: 300 und 211 bei einer Spanne von 12 bis 479 Kopien / 1000 *Actin* in der Gruppe; PA: 363 und 315 mg/g bei einer Spanne von 190 bis 1580). Die Haarwurzeln der SO-32-0-HR-Gruppe (Vektorkontrollen) zeigten alle eine niedrige *HSS*-Expression von unter 160 Kopien *HSS* / 1000 *Actin*. Zudem lagen jeweils für SO-32-0-HR-2 und -3 sowie SO-32-0-HR-4 und -5 die PA-Gehalte sehr dicht beieinander (Abbildung 56), sodass aus dieser Gruppe nur Nr. 1, 3, 5 und 6 weiter untersucht wurden. Ebenso wurden die B- und C-Proben von SO-HSS1a-HR-12 und -14 sowie SO-HSS2-HR-3 ausgeschlossen. Generell wurde darauf geachtet, eine möglichst große Bandbreite verschiedener PA-Gehalte und Genexpressionsintensitäten zu erhalten, um die vorgefundene Variation der Haarwurzelkulturen darzustellen.

3.3.2.3. PA-Gehalt in *Symphytum*-Proben

Da für die verschiedenen Pflanzenorgane jeweils nur eine Messung einer Probe, die ein Gemisch von Material mehrerer Pflanzen enthielt, vorliegt, können keine Rückschlüsse auf Unterschiede im PA-Gehalt zwischen den Individuen gezogen werden. Dementsprechend ist Zurückhaltung bei der Interpretation der Daten geboten, vor allem bei kleinen Unterschieden zwischen verschiedenen Proben. Diese können im Bereich der natürlichen Variation liegen.

Mit Ausnahme von im Frühjahr gesammelten, ausgewachsenen Blättern von *S. officinale* wurden in allen untersuchten Pflanzenproben Pyrrolizidinalkaloide nachgewiesen. Dabei schwanken die gemessenen Gehalte erheblich (Abbildung 55). Anders als bei Allantoin (3.3.1.3) ist ein Zusammenhang mit der Jahreszeit nicht eindeutig erkennbar. Für *S. officinale* wurde in feinen Wurzeln im Frühjahr ein höherer Gehalt festgestellt, für mittlere Wurzeln hingegen im Sommer. Bei *S. x uplandicum* verhielt es sich umgekehrt.

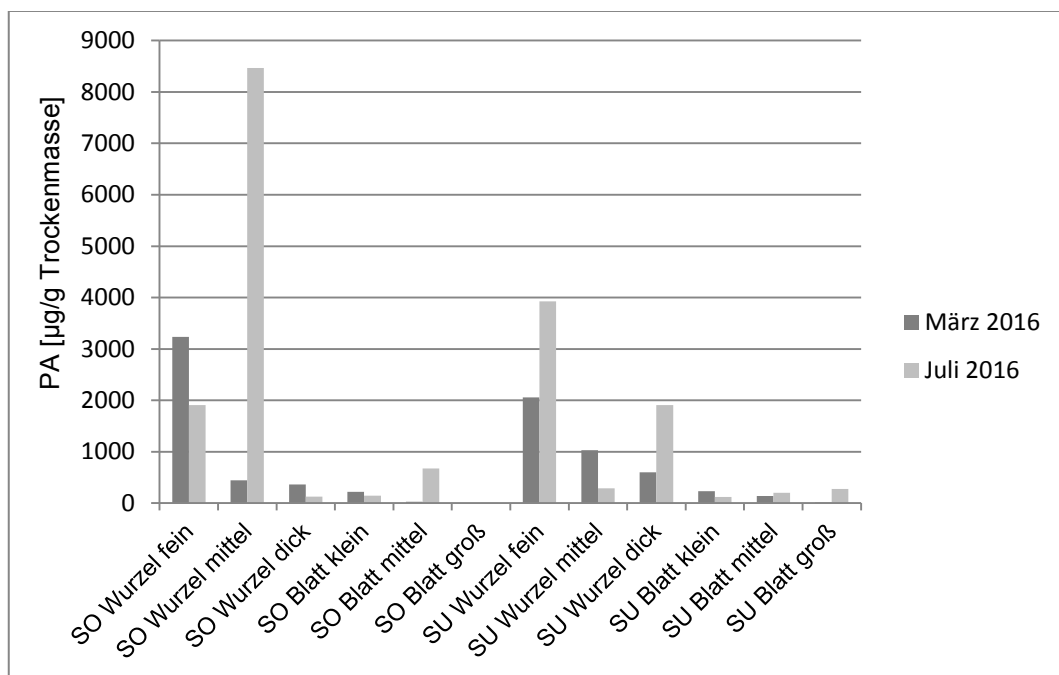


Abbildung 55: Gehalt an Pyrrolizidinalkaloiden in Beinwellpflanzen. Dargestellt ist der Gesamt-PA-Gehalt in Mischproben aus Material von jeweils 2-3 Pflanzen. In großen, im März gesammelten *S. officinale*-Blättern konnten keine PA detektiert werden. SO – *Symphytum officinale*, SU – *Symphytum x uplandicum*

Generell enthalten Beinwellwurzeln mehr PA als Blätter. Dicke, mehr als ein Jahr alte Speicherwurzeln von *S. officinale*, die den Hauptteil der Arzneidroge ausmachen, scheinen einen ähnlichen PA-Gehalt aufzuweisen wie die Blätter, während der Gehalt in feinen Wurzeln deutlich höher ist. In dicken Wurzeln von

S. x uplandicum wurden, verglichen mit *S. officinale*, im Frühjahr der 1,6-fache bzw. im Sommer der 15-fache Gehalt gemessen.

Der Gehalt an PA in Haarwurzelkulturen schwankt ebenfalls erheblich. In den Daten des kompletten Probensatzes A (Abbildung 56 und Abbildung 57) sind auch innerhalb der verschiedenen Gruppen (siehe Tabelle 15) große Unterschiede erkennbar. Für die mit Wildtyp-Bakterien erzeugten Linien reicht die Spanne bei SOHR von 190 µg/g (SOHR-5) bis 1577 µg/g (SOHR-9). In den SUHR-Linien wurden Gehalte zwischen 480 µg/g (SUHR-1) und 2216 µg/g (SUHR-4) gemessen. Damit unterscheiden sich der höchste und niedrigste Gehalt in den beiden Gruppen um das acht- bzw. viereinhalbfache. Die Mittelwerte der verschiedenen Gruppen (Tabelle 18) unterscheiden sich deutlich geringer. Der Variationskoeffizient ist mit 48 bis > 100 % des Mittelwertes sehr groß. Die Unterschiede zwischen einzelnen Linien derselben Gruppe sind größer als die Unterschiede zwischen den Gruppen. Eine Ausnahme bilden möglicherweise die Haarwurzeln mit den miRNA-Konstrukten 2 und 4a, die generell relativ niedrige PA-Gehalte im Bereich von 54 bis 360 µg/g aufweisen. Das liegt im Bereich des PA-Gehalts von Blättern. Jedoch gibt es in beiden Gruppen jeweils eine einzelne Linie mit vielfach höherem PA-Gehalt (SO-HSS2-HR-2 und SO-HSS4a-HR-5).

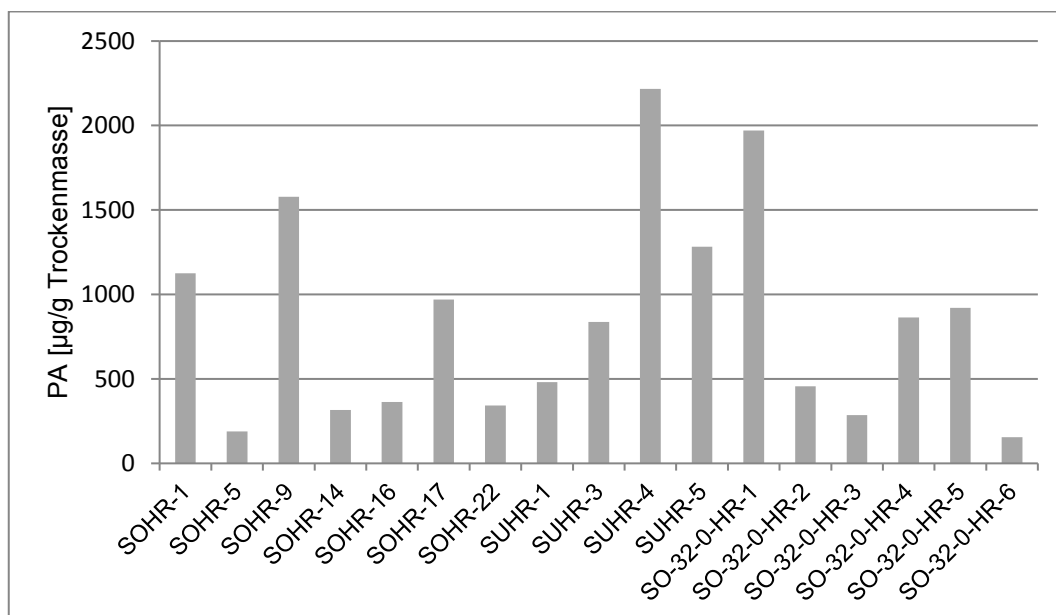


Abbildung 56: Gehalt an Pyrrolizidinalkaloiden in Haarwurzeln im Probensatz A (Kontrollen). Das Diagramm zeigt den PA-Gehalt in µg/g Trockenmasse. Von den vier SUHR-Linien konnte nicht genug Material für einzelne Messungen geerntet werden. Deshalb wurde eine Mischung aller drei Proben A-C untersucht.

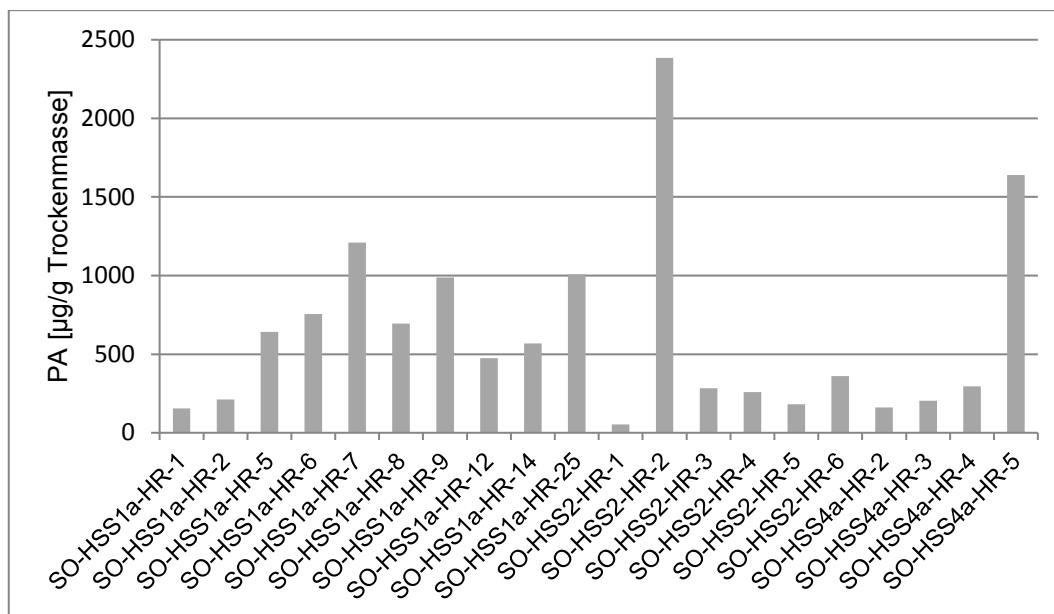


Abbildung 57: Gehalt an Pyrrolizidinalkaloiden in Haarwurzeln im Probensatz A (Linien mit miRNA-Konstrukten). Das Diagramm zeigt den PA-Gehalt in µg/g Trockenmasse. Die Linie SO-HSS4a-HR-1 fehlt, weil nicht genug Material für die Untersuchung gewonnen werden konnte.

Tabelle 18: PA-Gehalte nach Gruppen von Haarwurzellinien. Die Tabelle enthält Mittelwerte, Standardabweichungen und die prozentuale Variation der PA-Gehalte von Haarwurzelkulturen, zusammengefaßt nach Gruppen. Der Gehalt ist in µg/g Trockenmasse angegeben. Grundlage sind die Daten des Probensatzes A.

Gruppe	Mittelwert	Standardabweichung	Variation [%]
SOHR	697,9	489,0	70
SUHR	1203,8	649,8	54
SO-32-0-HR	775,2	603,4	78
SO-HSS1a-HR	670,8	322,6	48
SO-HSS2-HR	586,8	809,8	138
SO-HSS4a-HR	575,3	616,0	107

Nimmt man die Daten der Probensätze B und C hinzu, so wird das Bild noch heterogener. In Abbildung 58 wird deutlich, daß einige Linien (SOHR-5, SO-32-0-HR-3 und -6, SO-HSS1a-HR-1 und -2, alle mit drei Replikaten untersuchten SO-HSS2-HR-Linien) konstant niedrige PA-Gehalte unter 400, teilweise unter 200 µg/g bilden. SO-HSS1a-HR-9 liegt mit einem Mittelwert von 735 µg/g im mittleren Bereich. Alle anderen Linien zeigen über die drei biologischen Replikate eine sehr große Standardabweichung, was auf große Unterschiede zwischen den einzelnen Proben hindeutet. Aus diesem Grund wurden die Daten der Probensätze, wie zuvor die *HSS*-Expression (3.2.2.2), auch einzeln betrachtet (Abbildung 59).

Da die Werte nicht durchgängig in einem Probensatz höher oder niedriger als in den anderen waren, kann ein systematischer Fehler bei der Probengewinnung ausgeschlossen werden. In einigen Linien (z.B. SO-32-0-HR-1) sind die Unterschiede zwischen allen drei Versuchsansätzen sehr groß. Bei anderen (z.B. SO-HSS1a-HR-7) weicht nur ein Wert stark von den anderen ab.

Aufgrund dieser Unterschiede zwischen den Probensätzen wurde beschlossen, im Folgenden beim Vergleich von Expressionsdaten und Alkaloidgehalt nicht mit den Mittelwerten zu arbeiten, sondern die Daten der einzelnen Proben zu betrachten.

In jeweils drei Replikaten im Langtag bzw. in Dunkelheit kultivierter Kalluskulturen konnten keine Pyrrolizidinalkaloide nachgewiesen werden.

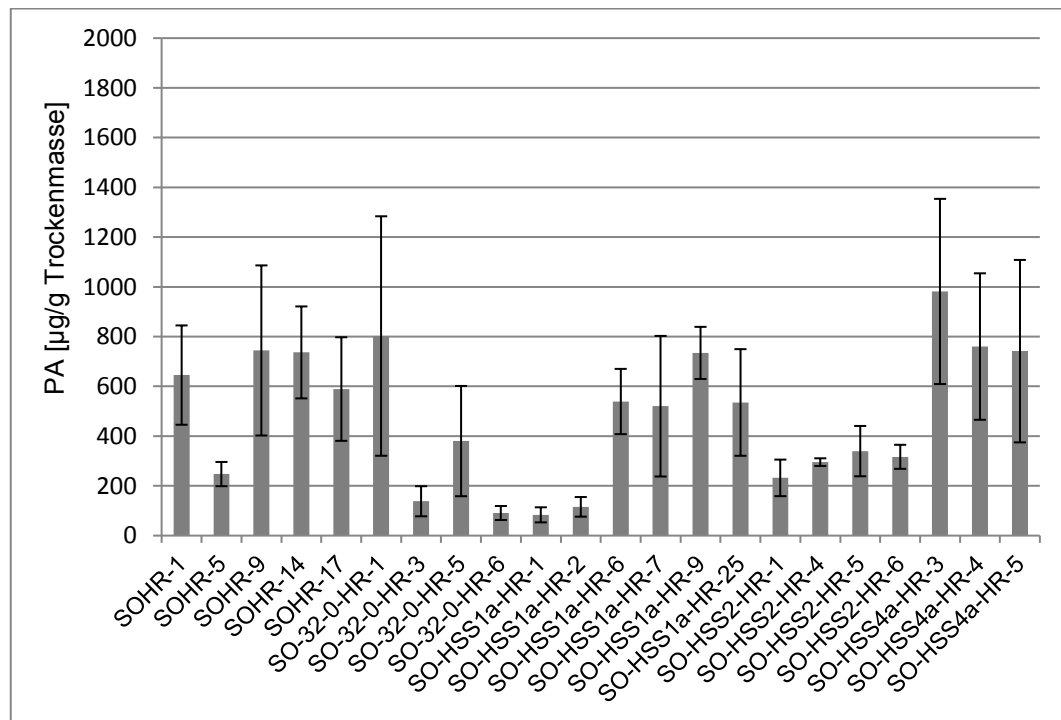


Abbildung 58: Gehalt an Pyrrolizidinalkaloiden in ausgewählten Proben von Haarwurzelkulturen (Mittelwerte). Dargestellt sind die Mittelwerte von drei biologischen Replikaten (A bis C) und der Standardfehler. Auffällig sind bei vielen Linien die großen Fehlerbalken, die auf starke Schwankungen zwischen den Versuchsansätzen hinweisen.

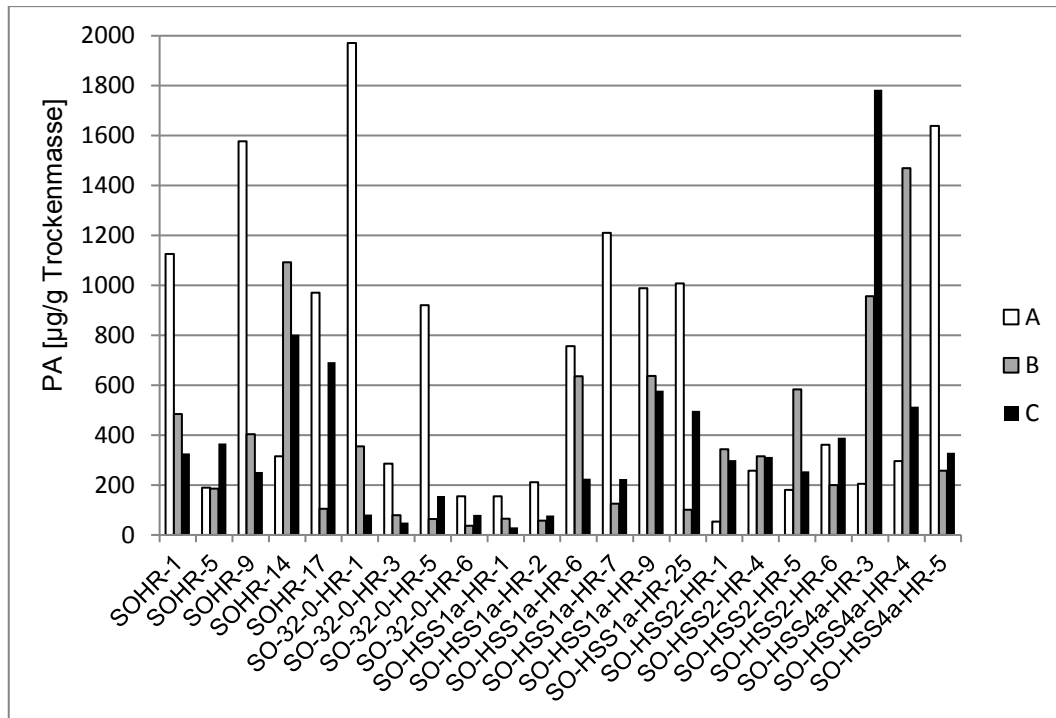


Abbildung 59: Gehalt an Pyrrolizidinalkaloiden in ausgewählten Proben von Haarwurzelkulturen (einzelne Replikate). Für jede Linie sind die Einzelwerte der Proben A bis C dargestellt. Es sind sowohl individuelle Unterschiede zwischen den Linien, als auch Schwankungen zwischen den Versuchsansätzen erkennbar. Dabei ergab jedoch kein Ansatz generell höhere oder niedrigere Werte als die übrigen.

3.4. Gibt es einen Zusammenhang zwischen *HSS*-Expression und Alkaloidgehalt?

Wie sich bereits bei der Betrachtung der vollständigen Datensätze für Genexpression (3.2.2.2) und PA-Gehalt (3.3.2.2) zeigte, ist es aufgrund starker intraindividuelle Schwankungen im Biosyntheseverhalten vieler Haarwurzellinien nicht sinnvoll, mit Mittelwerten der Probensätze A-C zu arbeiten. Daher wurden die Datenpaare probenweise betrachtet. Dabei wurde der umfangreichere Probensatz A vollständig mit einbezogen (mit Ausnahme der Linien, für die in der Analytik Mischproben verwendet wurden), wodurch insgesamt 76 Wertepaare betrachtet wurden.

Trägt man für jede Probe Genexpression und PA-Gehalt gegeneinander auf, so sind im resultierenden Diagramm drei Gruppen von Daten erkennbar (Abbildung 60): Datenpunkte, die der Y-Achse folgen und die von Proben stammen, die unabhängig von der *HSS*-Expression wenig PA enthielten; Datenpunkte, die der X-Achse folgen, also durchgehend eine niedrige *HSS*-Expression zeigen, trotz teilweise hoher Alkaloidgehalte; und Datenpunkte, die einer Geraden im Diagramm

folgen. Diese letzte Gruppe umfasst Proben, bei denen möglicherweise ein linearer Zusammenhang zwischen Genexpression und Alkaloidbiosynthese besteht, was die Arbeitshypothese stützen würde.

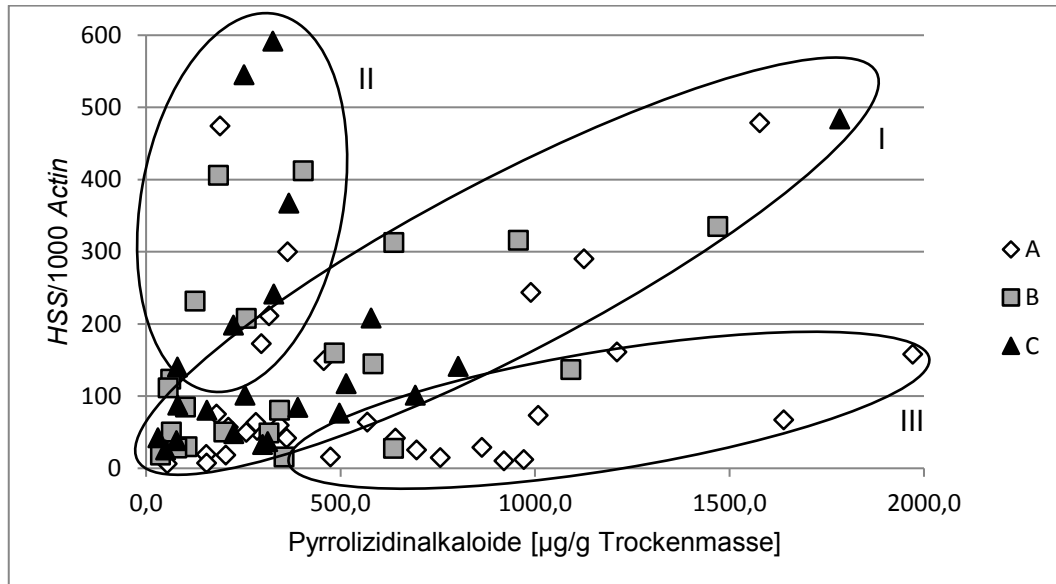


Abbildung 60: Zusammenhang von HSS-Expression und Alkaloidgehalt (vollständiger Datensatz). Das Diagramm zeigt für alle gemessenen Proben die HSS-Expression gegen den Alkaloidgehalt, aufgeschlüsselt nach Probensätzen (A für alle Linien, B und C reduziert). Es sind drei Gruppen erkennbar: Ein Teil der Proben (I) folgt einer Geraden, was für einen proportionalen Zusammenhang spricht. Die zweite Gruppe (II) folgt der Y-Achse, zeigt also unabhängig von der Genexpression einen niedrigen PA-Gehalt. Einige Datenpunkte (III) liegen nahe der X-Achse, zeigen also trotz niedriger HSS-Expression erhöhte Alkaloidgehalte.

Um herauszufinden, bei welchem Anteil der untersuchten Proben Genexpression und PA-Gehalt zusammenpassen, wurden die einzelnen Messwerte zunächst auf den jeweils höchsten gemessenen Wert bezogen, um eine einheitliche Skala zu erhalten. Für jede Probe wurde berechnet, bei wieviel Prozent des Maximalwertes die PA-Gehalte und die HSS-Kopien lagen. So war leichter feststellbar, welche Proben, verglichen mit den anderen, einen hohen oder niedrigen Alkaloidgehalt aufwiesen, bzw. viele oder wenige Genkopien enthielten. Im nächsten Schritt wurde die Differenz der relativen HSS- und PA-Mengen gebildet. So wurde der Abstand zwischen beiden Werten ermittelt, um zu erfassen, bei wievielen Proben beide Messgrößen gleichzeitig hoch oder niedrig waren bzw. sich unterschiedlich verhielten. Teilt man die Differenz der relativen PA-Gehalte und HSS-Kopienzahlen in Klassen von je 10 Prozentpunkten Breite ein und trägt die Häufigkeiten auf, so ergibt sich annähernd eine Normalverteilung (Abbildung 61). Der mittlere Teil der Glockenkurve umfasst den Bereich -20 % bis 20 %. Daher wurden Proben, für die der Abstand kleiner als zwanzig Prozentpunkte war, als

vergleichbar in Genexpression und Alkaloidgehalt gewertet (Abbildung 62). Sie umfassen 66 % der Proben, das heißt zwei Drittel der untersuchten Proben stützen die Arbeitshypothese eines Zusammenhangs zwischen *HSS*-Expression und PA-Biosynthese.

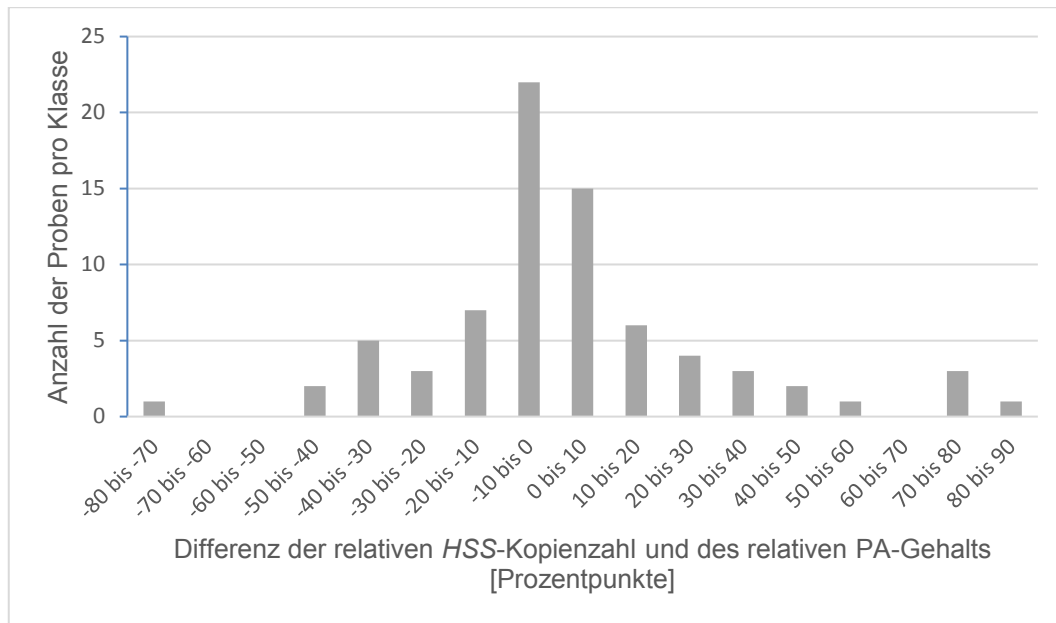


Abbildung 61: Häufigkeitsverteilung der Abstände von Genexpression und PA-Gehalt. Dargestellt ist die Anzahl der Proben nach Differenz der relativen *HSS*-Kopienzahl und des relativen PA-Gehalts (jeweils bezogen auf den höchsten in Haarwurzeln gemessenen Wert) in jeweils zehn Prozentpunkte breiten Klassen. Es ergibt sich annähernd das Bild einer Normalverteilung.

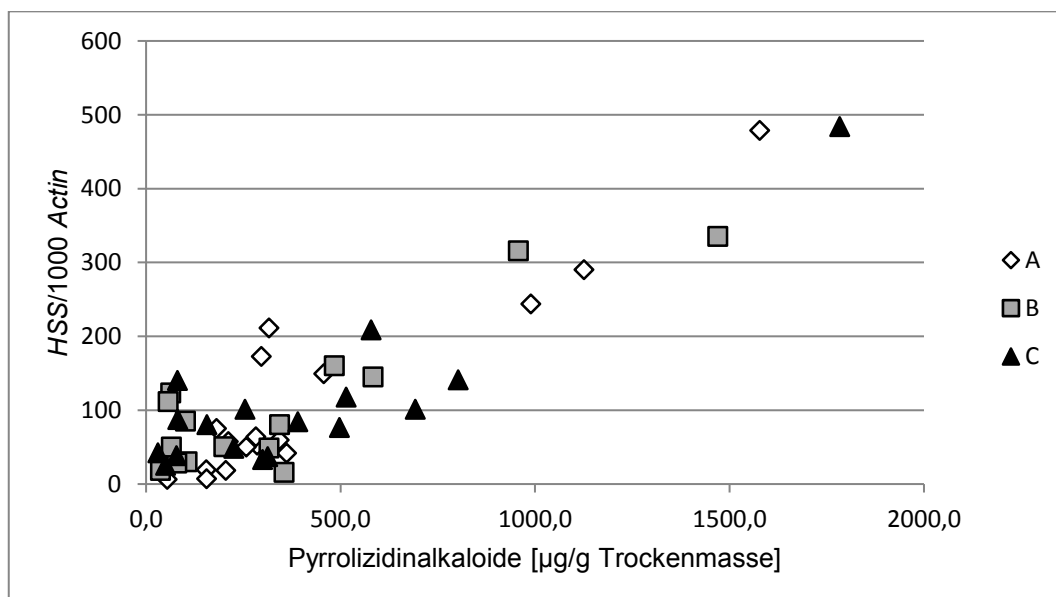


Abbildung 62: Zusammenhang von *HSS*-Expression und Alkaloidgehalt (reduzierter Datensatz). Dargestellt sind nur die Datenpunkte aus Abbildung 60, die für einen Zusammenhang von Genexpression und Alkaloidgehalt sprechen. Das sind 66 % des gesamten Datensatzes. Weitere Erläuterungen finden sich im Text.

SOHR-5 zeigte durchgehend in allen drei Replikaten eine niedrige PA-Produktion zwischen 9 und 19 % des Maximalwertes bei relativ hoher *HSS*-Expression (62-80 %). Bei 10 weiteren Linien lagen beide Werte in allen drei Replikaten weniger als 20 Prozentpunkte auseinander. Bei denjenigen der übrigen Linien, für die drei Replikate untersucht wurden, wich das Verhalten einer Probe von den anderen beiden ab, bei zwei Linien sogar in die entgegengesetzte Richtung: SO-HSS1a-HR-7 und SO-HSS4a-HR-5 zeigten jeweils in der A-Probe einen hohen PA-Gehalt bei niedriger *HSS*-Kopienzahl, in B und C jedoch das umgekehrte Verhältnis. Eine Übersicht mit den Daten aller einbezogenen Proben ist in Tabelle 19 im Anhang dargestellt.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sich verschiedene Haarwurzellinien deutlich in Wachstum und Biosynthesekapazitäten unterscheiden können, auch wenn sie unter Verwendung der gleichen Organismen erzeugt wurden. Es handelt sich um Individuen, die jeweils einzeln untersucht werden müssen, um eine eventuelle Eignung für biotechnologische Anwendungen zu beurteilen. Dennoch lassen sich im Mittel durchaus Unterschiede in Abhängigkeit vom verwendeten Ausgangsmaterial beobachten.

Die Expression des Homospermidinsynthase-Gens korreliert tatsächlich in den meisten Fällen mit dem PA-Gehalt. Es gibt allerdings auch Ausnahmen. Diese Ergebnisse werden im folgenden Kapitel (unter 4.4) diskutiert, ebenso die Biosynthesekapazität der Organkulturen verglichen mit den Gewächshauspflanzen (4.2 für Allantoin und 4.5 für die Alkaloide).

4. Diskussion

Bei *Symphytum officinale* handelt es sich um eine lange genutzte Heilpflanze mit antiphlogistischer, analgetischer und abschwellender Wirkung (Staiger 2012; Wichtl 2002) (siehe 1.1.2). Aufgrund der Förderung der Geweberegeneration wurden Zubereitungen aus Beinwell traditionell zur Behandlung von Knochenbrüchen („Wallwurz“), Wunden und Gastritis eingesetzt, ohne die dafür verantwortlichen Inhaltsstoffe zu kennen. Heute wird die Wirkung hauptsächlich Allantoin und Rosmarinsäure zugeschrieben (Andrès et al. 1989). Allerdings mehren sich die Hinweise darauf, dass auch weitere Inhaltsstoffe dafür bedeutsam sind, unter anderem eine Polysaccharidfraktion (untersucht an *S. asperum*, Barbakadze et al. 2009). Da die Vielzahl relevanter Stoffe und Stoffgruppen in der vorliegenden Arbeit nicht erfasst werden konnte, wurde Allantoin als Leitsubstanz bestimmt.

Seit den 1970er Jahren ist bekannt, dass Beinwell Pyrrolizidinalkaloide (PA) enthält, die hepatotoxisch, mutagen und kanzerogen wirken (Mattocks 1968; Stengl et al. 1982). Infolge dieser Erkenntnisse wurde die medizinische Anwendung von Beinwell und dessen Zubereitungen stark eingeschränkt. Die Verwendung der Droge ist nicht mehr gebräuchlich, da die Einhaltung der Grenzwerte zur Aufnahme von Pyrrolizidinalkaloiden nur durch gereinigte Extrakte möglich ist. Der Einsatz der derzeit erhältlichen Fertigarzneimittel ist auf stumpfe Verletzungen bei intakter Haut beschränkt (Wichtl 2002). Bei Einnahme, Anwendung auf Schleimhäuten oder Wundbehandlung wäre die Aufnahme von PA-Restmengen höher, da die Hautbarriere fehlt. PA-freie Extrakte würden eine Erweiterung der Anwendungsgebiete ermöglichen. Ein Weg, dies zu erreichen, wäre eine Eliminierung der Alkaloide aus dem Ausgangsmaterial, oder zumindest eine starke Senkung des Gehalts.

Pyrrolizidinalkaloide sind nicht nur in Beinwell ein Qualitätsproblem, sondern auch in weiteren Arzneipflanzen. Teilweise stammen sie aus Verunreinigungen mit anderen, ähnlichen Pflanzen (z.B. Pestwurzblätter in Huflattichblättern aus Wildsammlungen, *Senecio*-Arten als Unkräuter im Anbau), teilweise aus der Arzneipflanze selbst wie z.B. bei der Anwendung von Pestwurzextrakten zur Migräneprophylaxe (Diener et al. 2004; Röder 1995).

Ein Lösungsansatz zur Senkung des Alkaloidgehalts wäre Zucht und Anbau PA-armer Sorten. Ein Beispiel hierfür ist Huflattich (*Tussilago farfara*, siehe auch Wichtl (2002)), von dem inzwischen PA-freie Sorten verfügbar sind (Kopp et al.

1997; Wiedenfeld 1997). Die PA-freie Huflattichsorte „Wien“ ist EU-weit geschützt (Bundessortenamt 2002). Allerdings ist hierzu anzumerken, dass der PA-Gehalt von Huflattichblättern generell sehr gering ist (häufig nur in Spuren) und sie nicht in allen Herkünften zu finden sind. Zudem besitzen zwei prominente PA, Tussilagin und Isotussilagin, ein gesättigtes Necingerüst und sind somit nicht toxisch (Röder et al. 1981) (siehe Struktur-Wirkungs-Beziehung im Abschnitt 1.2.2). Bekannt gewordene Fälle von Intoxikationen durch Huflattichtee gehen wahrscheinlich auf Verunreinigungen der Droge zurück (Roulet et al. 1988; Sperl et al. 1995; Stuppner et al. 1992). Die deutlich höheren Gehalte und die universelle Verbreitung von PA in *Symphytum* lassen erwarten, dass die Zucht PA-freier Beinwellsorten schwieriger und langwieriger wäre als im Falle des Huflattichs.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein biotechnologischer Ansatz erprobt: Die Verringerung der Bildung eines zentralen Enzyms aus dem Biosyntheseweg der PA mit gentechnischen Methoden, konkret dem Abbau der Ziel-mRNA durch künstliche microRNA. Dies wurde wegen der besseren Handhabung im Labor in Organkulturen (Haarwurzeln) durchgeführt. Zudem bieten Haarwurzelkulturen die Möglichkeit einer Produktion wertvoller Inhaltsstoffe unter kontrollierten Bedingungen im Bioreaktor, wodurch umweltbedingte Schwankungen der Gehalte vermieden werden und unabhängig von der Jahreszeit produziert werden kann. Umweltbedingungen wie Licht, Temperatur und Bodenzusammensetzung haben einen großen Einfluss auf Mengen und Komposition der Sekundärmetabolite (Übersicht in (Yang et al. 2018)). Jahreszeitliche Schwankungen können bedeutender sein als die Auswirkungen genetischer Unterschiede (Sampaio et al. 2016). Im Bioreaktor können diese Umweltbedingungen konstant gehalten und optimiert werden. Dabei umgeht die Arbeit mit Zell- und Organkulturen die Probleme, die mit dem Feldanbau von GVO-Pflanzen verbunden sind. Außerdem ist in Erwägung zu ziehen, dass eine Verringerung der PA-Gehalte in Freilandpflanzen die Anfälligkeit für Schadinsekten erhöhen könnte.

Das gewählte Enzym Homospermidinsynthase war zu Beginn der Arbeit das einzige bekannte Enzym des Biosyntheseweges. Darüber hinaus ist es auch durch seine Funktion am Beginn des Biosyntheseweges ein sinnvoller Ansatzpunkt. Aus der Suppression von Enzymen, die weiter hinten im Biosyntheseweg benötigt werden, kann sich statt einer Verringerung der Gesamtmenge der betreffenden Metaboliten eine Verschiebung der Zusammensetzung ergeben. Die Expression der Gene, die für Enzyme eines Biosyntheseweges des Sekundärstoffwechsels codieren, ist in der Regel aufeinander abgestimmt, beispielsweise durch gemeinsame Transkriptionsfaktoren oder, bei Genen, die in räumlicher Nähe

angeordnet sind, möglicherweise auch auf Chromatinebene (Chezem & Clay 2016; Osbourn 2010). Eine Störung durch Verminderung eines Enzyms, das einen späten Schritt katalysiert, kann zur verstärkten Bildung seltener Metabolite oder zur Akkumulation von Zwischenprodukten führen. So wurde in *Papaver somniferum* bei Suppression der Codeinreduktase mittels RNA-Interferenz (RNAi) eine Verringerung des Gehalts an Morphin und Codein festgestellt, während andere Alkaloide sowie die Vorstufe Reticulin in größeren Mengen gefunden werden (Allen et al. 2004). In *Nicotiana tabacum* führte die Unterdrückung der Putrescin-Methyltransferase durch eine *Antisense*-Sequenz zu einer Verschiebung der Alkaloidzusammensetzung hin zu seltenen Stoffen wie Anatabin (Chintapakorn & Hamill 2003). Eine Übersicht mit weiteren Beispielen bietet Ncube & Van Staden (2015). Wenn nicht die Änderung der Produktzusammensetzung, sondern die Ausschaltung einer Biosynthese angestrebt ist, ist es somit sinnvoll, möglichst weit vorn anzusetzen.

Im Folgenden werden die experimentell untersuchten Fragestellungen und die erzielten Ergebnisse diskutiert. Die Themen erstrecken sich dabei von der Kulturerzeugung in *Symphytum*, Wachstum und Metabolitenbildung in den verschiedenen Beinwell-Haarwurzeltypen zu der Frage, ob der hier gewählte Ansatz zur Unterdrückung der PA-Biosynthese für die Produktion von Pflanzenextrakten mit wertvollen Inhaltsstoffen bei verringertem PA-Gehalt geeignet ist.

4.1. Erzeugung und Wachstum von *Symphytum*-Haarwurzelkulturen mit und ohne zusätzliche Transgene

Die Erzeugung von Haarwurzelkulturen mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methode (Methoden, 2.2.2) erwies sich für *S. officinale* als einfach und effizient. Es konnten zahlreiche Haarwurzellinien etabliert werden, von denen die meisten schnell wuchsen und sich früh verzweigten. Die Erzeugung von Kulturen mit *S. x uplandicum* war deutlich schwieriger. Die Explantate neigten stärker zum Verbräunen und starben rascher ab. Es konnten pro Versuchsansatz viel weniger Haarwurzeln erzeugt werden und diese wuchsen deutlich langsamer. Somit ist *S. officinale* für die Erzeugung von Haarwurzeln besser geeignet. Ursache für die Verbräunung und das Absterben ist die Bildung phenolischer Substanzen als Reaktion auf die Verwundung und die Infektion mit *Agrobacterium* (Compton &

Preece 1988). Diese Reaktion war bei *S. x uplandicum* stärker ausgeprägt. Ob diese Art generell höhere Phenolgehalte aufweist als *S. officinale* wurde nicht untersucht. Möglicherweise lässt sich die Infektion durch *Agrobacterium* durch die Anwendung von Ultraschall verbessern, wie dies bei der Königskerze gelungen ist (Georgiev et al. 2011). Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit nicht erprobt.

Die Transformationsraten lagen für das Kontrollplasmid (pMDC32-0) und das miRNA-Konstrukt pALmiRhss1a zwischen 30 und 40 %, für pALmiRhss2 und pALmiRhss4a bei 67 bzw. 64 %. Literaturangaben zur Transformationseffizienz mit einem weiteren Plasmid neben pRi in *A. rhizogenes* schwanken stark in Abhängigkeit vom verwendeten Plasmid und der transformierten Pflanzenspezies. Petit et al. (1986) erzielten mit dem in dieser Arbeit genutzten Ri-Plasmid (pRi15834) und dem Ti-Plasmid pGV3850 Co-Transformationen von 46 % (*Daucus carota*) und 50 % (*Lotus corniculatus*). Simpson et al. (1986) berichteten von 100 % transformierten Haarwurzeln von *Medicago sativa* mit pRiA4 und einem binären Plasmid, das nur einen Selektionsmarker trug, allerdings mit nur sieben erzeugten Linien. Hingegen erreichten Chen et al. (1999) bei *Artemisia annua* nur 11 % mit dem Vektor pRi15834 und einem binären Plasmid, welches ein Farnesyldiphosphatsynthetasegen enthielt. Innerhalb dieser großen Bandbreite sind die Transformationsraten von *S. officinale* und pRi15834 in Verbindung mit den in dieser Arbeit verwendeten transgen-tragenden Plasmiden im mittleren Bereich einzuordnen. Die Erzeugung transgen-tragender Haarwurzelkulturen ist mit diesem System gut möglich.

Nach Mishiba et al. (2005) kann die recht unterschiedliche Transformationsrate bei verschiedenen Kombinationen von Pflanze und Plasmid auch das Resultat epigenetischer Mechanismen sein. Die Autoren hatten eine Stilllegung des Selektionsmarkers durch Methylierung des Promotors beobachtet, insbesondere bei Linien, die mehrere Kopien der betreffenden T-DNA enthielten. Der Effekt trat vor allem bei T-DNAs auf, die sowohl vor dem Zielgen, als auch vor dem Selektionsmarker den 35S-Promotor trugen, was auch bei den Plasmiden der pMDC-Reihe, die hier zur Anwendung kamen, der Fall ist. Das Phänomen der Methylierung war in *Gentiana* stark ausgeprägt, bei Tabak hingegen nicht auffällig. Eine Unterdrückung des Selektionsmarkers, im Falle der vorliegenden Arbeit der Hygromycinresistenz, durch epigenetische Mechanismen führt zu einem Aussortieren der betreffenden Linien im Selektionsschritt. Diese Linien sterben ab, obwohl sie die gewünschte T-DNA enthalten (falsch negativ). Dadurch erscheint die Transformationsrate niedriger als sie tatsächlich ist.

Möglich ist auch eine Stilllegung der T-DNA in Abhängigkeit vom Integrationsort. Nach Integration in einen stark methylierten Bereich der DNA kann die Methylierung aus den flankierenden Sequenzen in die T-DNA einwandern (Grewal & Elgin 2002; Matzke et al. 2000). Beide Phänomene könnten die hier ermittelten Transformationsraten beeinflusst haben bzw. die Funktionalität der Konstrukte beeinträchtigen. Der Methylierungsgrad der integrierten DNA wurde nicht untersucht.

Zur Beurteilung des Wachstums von Haarwurzeln findet man in der Literatur zumeist Angaben zur Frischmasse, teilweise auch zur Trockenmasse in Flüssigkultur nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten. Diese Methode wurde für die vorliegende Arbeit in Vorversuchen erprobt, aber verworfen, weil es sich als schwierig erwies, das Medium vor der Bestimmung der Frischmasse aus den dicht verwobenen Wurzelballen zu entfernen. Der dadurch bedingte Fehler ist umso größer, je mehr Biomasse geerntet wird. Die Bestimmung eines Wachstumsfaktors über die Trockenmasse ist ebenfalls ungenau, da der Ausgangswert auf diese Weise nur rechnerisch aus dem Frischgewicht ermittelt werden kann. Die im Vorversuch ermittelten Biomassezuwächse in flüssigem MS-Medium über 14 Tage lagen für die SOHR-Linien bei einer 3,1-fachen bis 8,8-fachen Zunahme. Die Biomasse von SUHR-1 hatte nach 14 Tagen das 1,1-fache erreicht, die von SUHR-2 das 1,5-fache. Diese unterschiedlichen Wachstumsraten von *S. officinale*- und *S. x uplandicum*-Linien passen gut zu den mit anderen Methoden ermittelten und im Ergebnisteil (siehe 3.1.2) dargestellten Daten.

In der Literatur finden sich sehr unterschiedliche Wachstumsraten: So ergab sich für transgene Kartoffelkulturen (Kumar et al. 2006) eine Verdopplung alle 2,3 Tage. Grąbkowska et al. (2010) beobachteten bei *Harpargophytum procumbens* eine Zunahme der Frischmasse auf das 4-7-fache nach 28 Tagen in Flüssigkultur, während *Ruta graveolens* in 30 Tagen nur die 2,2-4,2-fache Frischmasse erreicht (Sidwa-Gorycka et al. 2009). Transgene Haarwurzeln von *Atropa belladonna* erreichten nach einer Woche die 2-4-fache Frischmasse (Hashimoto et al. 1993). Damit sind die Daten zu den *Symphytum officinale*-Linien vergleichbar mit den schneller wachsenden Haarwurzeln wie Kartoffel und Tollkirsche, die *S. x uplandicum*-Linien eher mit den langsameren wie Weinraute. Generell ist von einer großen Variation in Abhängigkeit von der Spezies auszugehen, während die Unterschiede zwischen verschiedenen Linien einer Art vergleichsweise kleiner sind. Die doppelte Biomasseproduktion, die sich bei den am stärksten wachsenden Linien im Vergleich zu den langsamsten findet, ist dennoch produktionsrelevant,

weshalb es sinnvoll ist, Wachstumsparameter zu ermitteln und als Auswahlkriterium zu nutzen.

Einzelne Linien zeigten starke Abweichungen nach unten, vor allem SO-HSS4a-HR-1, die kaum Verzweigungen und entsprechend sehr wenig Biomasse bildet. Ursache dafür ist möglicherweise der Integrationsort einer der aufgenommenen T-DNAs. Bei vollständiger Übertragung erhält die Pflanzenzelle mit dem verwendeten System drei verschiedene T-DNAs (rechte und linke T-DNA von pRi sowie die T-DNA des pMDC32-Derivats, welche das Konstrukt trägt). Häufig werden auch Mehrfachintegrationen beobachtet (Buck et al. 2009; Byrne et al. 1983). Weitere Ausführungen zur Problematik Kopienzahl und Integrationsort in Beinwell folgen in 4.4.

Auf Grundlage der erhobenen Wachstumsparameter ist keine Korrelation zwischen dem Wachstum der Kulturen einerseits und der Expression von *HSS* oder dem Alkaloidgehalt andererseits erkennbar. Für Allantoin zeigt sich eine schwache Tendenz hin zu höheren Gehalten in den Linien, die geringeres Längenwachstum zeigen und von denen weniger Material geerntet werden konnte. Allerdings gibt es auch Ausnahmen (z.B. SOHR-1; siehe Tabelle 17 in Abschnitt 3.3.1.3). Zudem ist der Unterschied in der Erntemasse zumeist größer, sodass die Gesamtausbeute für die Linien mit stärkerer Biomasseproduktion trotz geringeren Gehaltes höher ist.

4.2. Produktion von Allantoin in Haarwurzelkulturen

Nach Literaturangaben (Wichtl 2002) enthält die Droge Beinwellwurzel (*Radix Symphyti*) 0,6-0,8 % Allantoin, was 6-8 mg/g entspricht. Bei einem Restwassergehalt von 10-15 % (Hänsel & Sticher 2007) ergibt sich ein Allantoingehalt von 7-9,5 mg/g bezogen auf die Trockenmasse. Andere Quellen sprechen von rund 9,4 mg/g im Spross und 25,8 mg/g in der Wurzel bei luftgetrocknetem Material (Dresler et al. 2017), bzw. 0,6-4,7 % (Dennis et al. (1987), zitiert nach Staiger (2012)). Damit ergibt sich ein Bereich von ca. 6 bis 26 mg/g Trockenmasse aus der Literatur, was auf große Schwankungen je nach Population, Standort und Erntezeitpunkt schließen lässt. Zudem ist die genaue Methodik, nach der die Werte ermittelt wurden, nur teilweise zugänglich, sodass ein diesbezüglicher Vergleich hier nicht möglich war.

Zur Einschätzung der Produktivität von Haarwurzelkulturen ist festzustellen, dass der Allantoingehalt der Linien, deren Gehalt im oberen Bereich der beobachteten Spanne liegt, mit dem der dicken Beinwellwurzeln vergleichbar ist oder nur wenig

niedriger liegt. Diese sind Hauptbestandteil der klassischen Arzneidroge. In den untersuchten Haarwurzellinien wurden Allantoingehalte von 10-20 mg/g Trockenmasse bestimmt. Die dicken, mehr als ein Jahr alten Wurzeln, die den Hauptbestandteil der Droge ausmachen, lagen je nach Erntezeitpunkt und Sorte bei 20-30 mg/g Trockenmasse.

Der hier festgestellte Unterschied zwischen den Messwerten und den Literaturangaben zum Allantoingehalt der Droge kann sich aus mehreren Ursachen ergeben. Methodische Fehler der für die vorliegende Arbeit ermittelten Werte liegen bei etwa 10 %. Größer ist wahrscheinlich der Einfluss natürlicher Schwankungen, speziell bei den Daten der Wurzelproben, da jeweils nur eine Mischprobe mit Material von zwei Pflanzen gemessen wurde. Die Daten müssten durch weitere Messungen abgesichert werden, möglichst auch mit wild gewachsenem Pflanzenmaterial von verschiedenen Standorten. Die regelmäßige Düngung der Gewächshauspflanzen erlaubt diesen möglicherweise die Bildung höherer Allantoingehalte als im Freiland. Daneben wird die Bildung von Sekundärmetaboliten von zahlreichen Faktoren beeinflusst, darunter Lichtintensität, Temperatur, Verfügbarkeit von Wasser, Schädlingsbefall, um nur einige zu nennen (Yang et al. 2018). Hinzu kommen mögliche Wirkstoffverluste der Droge durch Trocknung und Lagerung, während das für die vorliegende Arbeit verwendete Probenmaterial zügig eingefroren, gefriergetrocknet und bei -20°C gelagert wurde.

Zum Allantoingehalt der Pflanzen und dessen Änderungen können, wie bereits angeführt, keine gesicherten Aussagen gemacht, sondern nur Tendenzen festgestellt werden. Wurzeldrogen werden üblicherweise im Frühjahr oder Herbst geerntet. Dazu passt, dass die im Frühjahr gesammelten Wurzelproben etwas höhere Allantoingehalte aufwiesen als die im Sommer gesammelten. Dies ist jedoch besonders auffällig bei Wurzeln mit einem Durchmesser von $\leq 0,5$ cm, die für die Produktion wenig bedeutend sind. Unterschiede zwischen *S. officinale* und *S. x uplandicum* betrafen hauptsächlich den Gehalt in den Blättern, der in *S. x uplandicum* deutlich höher ist. Dies ist für die Herstellung von Zubereitungen aus den oberirdischen Pflanzenteilen relevant, die in manchen Fertigarzneimitteln (z.B. Traumaplast®) Verwendung finden.

Wie bereits in der Einleitung (1.1.2) ausgeführt wurde sind neben Allantoin, das als Leitsubstanz gemessen wurde, noch weitere Stoffe an der Wirkung beteiligt. Dabei handelt es sich unter anderem um Phenolcarbonsäuren, insbesondere Rosmarinsäure, Polysaccharide und Saponine. Das Zusammenwirken der

Inhaltstoffe und der Anteil einzelner Substanzen an der Wirkung sind noch nicht völlig aufgeklärt. Um die Eignung der Haarwurzeln zur Produktion therapeutisch verwendbarer Extrakte zu überprüfen wäre es sinnvoll, ein biologisches Testsystem, beispielsweise für die Beeinflussung von Entzündungsreaktionen oder zur Wundheilung, zu nutzen und statt eines Inhaltsstoffs direkt die Wirkung zu erfassen. Während die Wundheilung neben klinischen Studien mittlerweile auch an Hautmodellen untersucht werden kann (z.B. T-Skin™ von EPISKIN, Lyon, Frankreich oder Phenion® Full-Thickness Skin Model von Henkel, Düsseldorf) gibt es für die Entzündungshemmung keine *in vitro*-Modelle, die die Gesamtheit der Vorgänge abbilden. Gängige Methoden untersuchen nur die Wirkung auf einzelne Zielenzyme, meist Cyclooxygenasen, gelegentlich auch Phospholipase A₂ oder Lipoxygenase. Das Zusammenwirken mehrerer Enzyme und Signale läßt sich bisher nur im Tiermodell untersuchen (Rattenpfotenödem oder Mausohrödem). Eine Recherche in der Datenbank der Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch (ZEBET)¹⁸ ergab als Alternativmethoden nur *ex vivo*-Modelle für Lunge und Darm, um Asthma und chronisch entzündliche Darmerkrankungen zu erforschen. Ein komplexes, allgemeines Entzündungsmodell, das zur Untersuchung einer großen Zahl von Extrakten geeignet wäre, steht somit nicht zur Verfügung.

4.3. Beeinflussen die miRNA-Konstrukte die Expression von *HSS* und *DHS*?

Die Auswahl an Methoden zum Ausschalten von Genen in Pflanzen war zu Beginn dieser Arbeit noch sehr begrenzt. Gezielte Methoden zur Zerstörung von Genen in höheren Organismen (siehe 4.6) waren noch nicht entdeckt oder (wie Zinkfinger-nukleasen) nicht ausreichend in Pflanzen erprobt. Möglich war die ungezielte Mutagenese, zumeist durch T-DNA-Insertion. Dabei müssen sehr viele Kandidaten erzeugt und untersucht werden, um eine Insertion im gewünschten Gen zu erzielen. RNA-Interferenz-Methoden (RNAi) verringern die Transkriptmenge oder hemmen die Translation. Damit ist es möglich, gezielt die Funktion des Zielgens zu stören, allerdings erreicht man in der Regel nur eine Herabregulation, kein vollständiges Ausschalten.

Vor diesem Hintergrund wurde die Suppression mittels künstlicher microRNA gewählt, um die Menge an *HSS*-mRNA und in der Folge die Synthese des

¹⁸ <https://apps.bfr.bund.de/animalt-zebet/index.cfm>; Abruf 22.8.2018

korrespondierenden Enzyms zu verringern. Es wurden drei verschiedene miRNA-Konstrukte getestet (siehe 2.3.3 für die Beschreibung und 3.2.2 für die Ergebnisse), die an unterschiedlichen Stellen der mRNA binden. Konstrukt Nr. 1 bindet im vorderen Drittel, die beiden anderen in verschiedenen Positionen im hinteren Drittel. Dabei stellte sich die Frage, ob eine spezifische Wirkung der Konstrukte (die auf einem premiRNA-Gen von *Arabidopsis thaliana* basieren) in Beinwell nachweisbar ist, und ob sich die Effizienz der Konstrukte unterscheidet. Zudem bestand trotz genauer Planung ein Restrisiko der Beeinflussung des homologen Primärstoffwechselgens *DHS* (Hintergründe siehe 1.2.3), weshalb auch die Expression dieses Gens untersucht wurde.

Bei der Untersuchung der Expression von *DHS* wurde lediglich in vier von 76 Proben eine Aufregulation (relative Regulation >2) festgestellt, die mit maximal 6 gering ausfiel (die Expression von *HSS* unterschied sich teilweise um das 30-fache und mehr). Es war stets nur eine von drei Proben einer Linie betroffen. Eine Herabregulation, das erwartete Ergebnis bei einer spezifischen Bindung der miRNA an die *DHS*-mRNA aufgrund von Sequenzhomologie, wurde nicht beobachtet. Auf Basis dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die drei hier verwendeten, gegen *HSS* gerichteten künstlichen microRNAs die Menge an *DHS*-mRNA nicht beeinflussen.

Betrachtet man die Expression von *HSS* zunächst in den Wildtypkontrollen (SOHR-Linien), so fallen große individuelle Unterschiede zwischen den Linien auf. Wie in anderen Eigenschaften (z.B. Wachstum) zeigen sich neben Unterschieden zwischen verschiedenen Gruppen teils sehr große Abweichungen einzelner Kulturlinien. Haarwurzelkulturen sind stets als Individuen zu betrachten und umfassend zu untersuchen, da sie sich in einzelnen Merkmalen deutlich von anderen Linien einer sonst weitgehend homogenen Gruppe unterscheiden können. Beispiele aus anderen Arbeitsgruppen für große Unterschiede in Wachstum und Metabolitenproduktion zwischen verschiedenen Haarwurzellinien bei gleichem genetischem Hintergrund finden sich unter anderem bei Huang et al. (2014) mit *Gentiana scabra*, Hanafy et al. (2016) mit *Catharanthus roseus* sowie Renouard et al. (2018) mit *Linum flavum*. Diese Unterschiede sind sehr wahrscheinlich Folge der verschiedenen Kopienzahlen und Integrationsorte der T-DNA zwischen den Linien.

Mit Ausnahme einzelner Linien zeigen jene Kulturlinien, die neben der Wildtyp-T-DNA zusätzliche Transgene tragen, eine niedrigere *HSS*-Kopienzahl. Dabei zeigte sich für das Konstrukt 1a die größte Variabilität, allerdings wurde hier auch die größte Anzahl unabhängiger Linien untersucht. Im Mittel lag die Expression mit

100 Kopien / 1000 *Actin* niedriger als bei den Wildtyp-Linien mit rund 280 Kopien / 1000 *Actin*. Die Linien, die Konstrukt 2 enthalten, zeigten alle eine niedrige *HSS*-Kopienzahl von rund 70, diejenigen mit 4a eine hohe (im Mittel rund 200). Konstrukt 1a bindet im vorderen Drittel der mRNA, 4a und 2 im hinteren Drittel. Es ist hier kein Einfluss der Zielregion auf die Verringerung *HSS*-Kopienzahl erkennbar. Konstrukt 1a bindet möglicherweise auch in der Promotorregion von *HSS* (vorläufige Sequenz zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Dietrich Ober, Christian-Albrechts-Universität Kiel), allerdings mit mehreren nicht passenden Nukleotiden. Aus tierischen Systemen ist bekannt, daß eine Bindung kleiner RNAs im Promotor sowohl Repression, als auch Aktivierung des betreffenden Gens zur Folge haben kann (Vasudevan et al. 2007). Bei der Auswahl der Konstrukte 4a und 2 wurde darauf geachtet, eine Bindung im Promotor zu vermeiden. Dennoch zeigte sich in den 4a tragenden Linien eine geringere *HSS*-Herabregulation als in Linien mit 2 und 1a.

Allerdings war auch in allen Vektorkontrollen (32-0) eine niedrige *HSS*-Expression zu beobachten (Mittelwert ~70 Kopien *HSS* / 1000 *Actin*). Somit ist auf Grundlage des vorliegenden Datensatzes eine spezifische Wirkung der miRNA-Konstrukte nicht eindeutig nachweisbar (siehe auch Abschnitt 3.2.2.2).

Da die Haarwurzeln in der Kulturerhaltung auf antibiotikafreiem Medium angezogen wurden, ist auch eine Abschaltung der Transgene denkbar (Bettany et al. 1998; Osabe et al. 2017), obwohl einmal etablierte Haarwurzelkulturen in ihrer Metabolitenproduktion sehr stabil sein können (Häkkinen et al. 2016). Zwischen der Etablierung der Linien und der Probenanzucht lag mehr als ein Jahr. Aus diesem Grund wurde in dem Zeitraum, in dem Anzucht und Sammlung des Probenmaterials erfolgte, auch der Test auf Hygromycinresistenz zweimal wiederholt. Tatsächlich starben SO-HSS1a-HR-6 und -7 in beiden Versuchen ab, was dafür spricht, dass mindestens die Hygromycinresistenz abgeschaltet war (siehe auch 4.1). Allerdings zeigte Linie 7 mit rund 200 Kopien *HSS* / 1000 *Actin* eine mittlere Expression, Linie 6 mit < 50 sogar eine niedrige. Interessant ist die Linie SO-HSS4a-HR-3, die im ersten Versuchsansatz hygromycinresistent war, im zweiten hingegen nicht. Die Kopienzahl von *HSS* lag im Ansatz A bei 19, in B bei 316 und in C bei 484 Kopien / 1000 Kopien *Actin*. Möglicherweise wurden sowohl die Hygromycinresistenz, als auch das miRNA-Konstrukt stillgelegt. Dies lässt sich als Hinweis auf einen Einfluss der eingebrachten Transgene deuten.

4.4. Beeinflußt die Regulation der *HSS*-Expression den PA-Gehalt?

Grundlage des Projekts war die Arbeitshypothese, dass die Regulation von *HSS*, des Startenzym der PA-Biosynthese, bzw. der dieses codierenden mRNA, den Gehalt an Pyrrolizidinalkaloiden beeinflusst. Bei einer geringen Kopienzahl, die meist mit wenig Enzym korreliert ist, wurde ein relativ niedriger Alkaloidgehalt erwartet, bei hoher Kopienzahl dementsprechend ein relativ hoher PA-Gehalt. Diese Hypothese wird durch 66 % der vorliegenden Daten gestützt.

In dem Drittel der Proben, die von der Erwartung abweichen, sind zwei Gruppen zu unterscheiden: 11 Proben (14 %) mit hohem PA-Gehalt trotz niedriger *HSS*-Expression sowie 14 Proben (18 %) mit hoher *HSS*-Expression, aber dennoch niedrigem PA-Gehalt.

Eine plausible Ursache für die geringe Biosynthese bei hoher Genexpression sind Störungen bei späteren Schritten des Biosynthesewegs, z.B. aufgrund eines ungünstigen Integrationsortes. Dabei können die Gene für Biosyntheseenzyme, Transkriptionsfaktoren oder deren regulatorische Sequenzen betroffen sein. Dies ist vor allem für die Linie SOHR-5 zu vermuten, die in allen drei Replikaten diese Abweichung zeigt. Theoretisch ließe sich ein solcher Einfluss durch Bestimmung der Integrationsorte der T-DNAs überprüfen. Praktisch ist dies durch die fehlende Kenntnis der weiteren beteiligten Enzyme und die generell sehr spärlichen Informationen zum Beinwell-Genom derzeit nicht durchführbar.

Eine andere mögliche Ursache für geringe PA-Gehalte trotz hoher *HSS*-Transkription sind negative Rückkopplungsmechanismen. So ist beispielsweise in Zellkulturen von *Eschscholzia californica* und *Catharanthus roseus* die Hemmung des biosyntheseinduzierenden Signalwegs durch die von der jeweiligen Pflanze gebildeten Alkaloide beobachtet worden (Heinze et al. 2015). Dies verhindert die Akkumulation zu großer Mengen der toxischen Substanzen in den Pflanzenzellen. Ob derartige Regulationsmechanismen in der PA-Biosynthese von Bedeutung sind, ist derzeit nicht bekannt.

Schwerer erklärbar ist ein hoher PA-Gehalt bei niedriger *HSS*-Kopienzahl. Möglicherweise führt eine effektivere Nutzung der verringerten RNA-Menge zu einer hinreichenden Enzymaktivität. Denkbar ist auch ein verringerter Abbau von *HSS*. Zudem besitzt auch das konstitutiv exprimierte Primärstoffwechselenzym DHS eine *HSS*-Aktivität (Ober & Hartmann 1999). Diese genügt möglicherweise, um den Verlust bzw. die Verringerung von *HSS* teilweise auszugleichen. Dabei ist das Ausmaß aufgrund der vielen möglichen Einflussfaktoren vor dem Hintergrund

einer herabregulierten *HSS*-Aktivität schwer abzuschätzen. Die Untersuchung der Frage, ob und, wenn ja, in welchem Umfang DHS den Beginn der PA-Biosynthese ermöglicht, wäre mit einer vollständigen Ausschaltung von *HSS* möglich. Dies konnte jedoch mittels künstlicher miRNA in *Symphytum* nicht erreicht werden.

In Pflanzen wurden die höchsten PA-Gehalte in feinen Wurzeln gemessen, bei deutlich geringerem Gehalt in Blättern und dicken, alten Wurzeln (siehe 3.3.2.3 und 4.5). Die Expression von *HSS* in Pflanzen wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Jedoch wurden an den für diese Arbeit verwendeten Pflanzen zuvor bereits semiquantitative Untersuchungen zur Expression von *HSS* vorgenommen (Hauswald 2013). Dabei wurde eine starke Expression in dünnen Wurzeln, Blüten und jungen Rosettenblättern nachgewiesen, sowie schwächere Expression in Blütenknospen und Blättern an der Infloreszenzachse. Das passt zu Daten der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Dietrich Ober (Christian-Albrechts-Universität Kiel), die in den genannten Organen ebenfalls eine Genexpression zeigen. Ein zusätzlicher Proteinnachweis war nur in Wurzeln, speziell in Zellen der Endodermis (Niemüller et al. 2012), sowie in Blüten und Blättern in direkter Nachbarschaft zu Infloreszenzen positiv (Kruse et al. 2017). Allerdings sind in Pflanzen auch Transportprozesse zu erwarten, sodass Bildung und Akkumulation von Sekundärmetaboliten nicht im selben Organ stattfinden müssen (Hartmann & Dierich 1998).

Zur biotechnologischen Abschaltung von Enzymen des Sekundärstoffwechsels finden sich in der Literatur weniger Beispiele als zur Verstärkung, zumeist durch Überexpression. Meist ist das Ziel die verstärkte Produktion gewünschter Inhaltsstoffe. Das in diesem Projekt verfolgte Ziel der Verringerung unerwünschter Metaboliten ist in diesem Kontext eher selten. Dennoch wurde die Herabregulation von Enzymen des Sekundärmetabolismus mit Methoden RNAi-Methoden in der Aufklärung von Biosynthesewegen genutzt. So senkt beispielsweise die Suppression der Tropioninreduktase II den Calystegingehalt in Kartoffel (Küster et al. 2017). Auch Änderungen der Metabolitenzusammensetzung hin zur gewünschten Substanz können auf diese Art erreicht werden, wie ein Beispiel aus *Artemisia annua* zeigt: durch die Herabregulation der Cinnamat-4-Hydroxylase konnte unter Senkung des Gehalts an p-Cumarsäure, Anthocyanen und Gesamtphenolen der Gehalt an Artemisinin erhöht werden (Kumar et al. 2016).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Expression von *HSS* einen Einfluss auf den PA-Gehalt hat. Eine Senkung der mRNA-Menge dieses einen Gens kann jedoch bestenfalls ein erster Schritt hin zu einer PA-freien Produktionskultur sein. Sinnvoll wäre die Nutzung einer der inzwischen

verfügbaren Methoden zur vollständigen Ausschaltung des Gens sowie die Aufklärung und Ausschaltung weiterer Enzyme des Biosyntheseweges (siehe 4.6).

4.5. Beurteilung der PA-Gehalte in Haarwurzelkulturen

Laut Wichtl (2002) enthält die Arzneidroge *Radix Symphyti*, die entzündungshemmend und abschwellend wirkt, 0,04-0,6 % Pyrrolizidinalkaloide. Bei einem Restwassergehalt von typischerweise 10-15 % (Hänsel & Sticher 2007) ergibt dies einen Gehalt von 440-7100 µg/g Trockenmasse. Röder (1995) nennt 0,02-0,18 % im Spross und 0,25-0,29 % in der Wurzel bei getrocknetem Material. Das entspricht 200-1800 µg/g im Spross und 2500-2900 µg/g in der Wurzel (jeweils bezogen auf die Trockenmasse). Damit liegt die Gehaltsangabe für PA in Beinwellwurzeln innerhalb des bei Wichtl für die Droge angegebenen Bereichs. Unter den vermessenen Proben dieser Arbeit sind dicke Speicherwurzeln, die im Frühjahr geerntet wurden, der Arzneidroge am ähnlichsten. Hier wurden 365 µg/g (*S. officinale*) und 600 µg/g (*S. x uplandicum*) gemessen. Diese Werte sind, verglichen mit den Literaturangaben, recht niedrig. Neben den bekanntermaßen starken individuellen Schwankungen des PA-Gehalts in Beinwell (Mütterlein 1993) müssen möglicherweise ungünstige Bedingungen im Gewächshaus in Betracht gezogen werden. Zudem ist denkbar dass der stärkere Kontakt mit Pathogenen und Herbivoren im Freiland im Vergleich zu den Gewächshauspflanzen zu einer Induktion der Alkaloidbiosynthese führt. El-Mawla (2010) konnte zeigen, dass Methyljasmonat in Haarwurzeln von *Echium rauwolfii* zu einer 19-fachen Erhöhung des Pyrrolizidinalkaloidgehalts führt. Aufgrund der Rolle dieses Pflanzenhormons in der Pathogenabwehr ist dies ein deutlicher Hinweis auf eine Funktion von PA als Abwehrsubstanzen und deren verstärkte Synthese bei Pathogenkontakt. Auch für andere Alkaloide (z.B. Tropanalkaloide) ist die Induktion der Biosynthese durch Bakterien- oder Pilzextrakte, die Pathogenbefall simulieren, bekannt (Chandra & Chandra 2011). Für *Cynoglossum*, eine weitere PA-führende Pflanze aus der Familie der Boraginaceae, wurde ein starker Einfluss der genetischen Unterschiede verschiedener Varietäten nachgewiesen (van Dam & Vrieling 1994), ebenso wie große jahreszeitliche Schwankungen des PA-Gehalts der oberirdischen Organe (Pfister et al. 1992). Auch von anderen PA-führenden Pflanzen ist eine große Variation des Gehalts je nach Standort und Jahreszeit bekannt (z.B. *Senecio*, *Crotolaria* (Johnson et al. 1985)).

In der vermessenen Stichprobe (jeweils Mischproben von zwei Pflanzen) wiesen dicke Wurzeln von *S. x uplandicum* verglichen mit *S. officinale* im Frühjahr den 1,6-fachen bzw. im Sommer 15-fachen Gehalt auf. Dies spricht dafür, dass *S. officinale* hinsichtlich einer geringen Toxizität das bessere Ausgangsmaterial für Produkte aus Beinwellwurzeln ist. In den Blättern wurden PA-Gehalte zwischen 100 und 300 µg/g gemessen und keine deutlichen Unterschiede zwischen den untersuchten Arten festgestellt. Aufgrund des höheren Allantoingehalts im Blatt bei vergleichbarem Alkaloidgehalt ist *S. x uplandicum* das bessere Ausgangsmaterial für Blattextrakte.

In feinen und mittleren Wurzeln wurden deutlich höhere Gehalte zwischen 1000 und 8500 µg/g gemessen. Diese machen jedoch nur einen kleinen Anteil der Droge aus.

Die erzeugten Haarwurzelkulturen wiesen sehr unterschiedliche PA-Gehalte auf. Die niedrigsten gemessenen Werte liegen im gleichen Bereich wie Beinwellblätter (50-360 µg/g), die höchsten sind mit bis zu 2200 µg/g vergleichbar mit feinen und mittleren Wurzeln. Dabei wurden die drei höchsten Werte in Wurzelproben gemessen. Diese Gehalte wurden von keiner Haarwurzelkultur erreicht. *S. x uplandicum*-Linien erreichen im Mittel beinahe den doppelten PA-Gehalt wie *S. officinale*-Linien, allerdings bei noch größeren Unterschieden zwischen individuellen Linien. Somit ist die aus den Daten in dieser Arbeit abgeleitete Aussage, daß *S. officinale*-Haarwurzeln weniger PA bilden als solche von *S. x uplandicum* mit großer Vorsicht zu treffen und eher als Tendenz zu verstehen. Es konnte bestätigt werden, dass in Kalluskulturen keine PA-Biosynthese nachweisbar ist.

Bei der Beurteilung der Qualität der Alkaloiddaten muss zwischen absoluten und relativen Werten unterschieden werden. Die absoluten Messwerte enthalten einen in seinem Umfang schwer abschätzbaren Fehler. Während der Arbeiten zur Kalibrierung fiel auf, dass die Messwerte der Standardlösungen über die Zeit allmählich anstiegen. Dies ist auf die langsame Verdunstung des Lösungsmittels (Methanol) trotz Aufbewahrung der Lösungen in dicht verschlossenen Gläsern bei -20°C zurückzuführen. Da alle drei Standards zur gleichen Zeit gelöst und unter den gleichen Bedingungen gelagert wurden betrifft dies die Stammlösungen der Kalibrierstandards ebenso wie die des internen Standards Heliotrin. Da sich also alle Standards in die gleiche Richtung veränderten, gleichen sich die Fehler teilweise aus. Zudem wurde der Standard allen Proben gleichzeitig zugesetzt. Aus diesem Grund sind die absoluten Messwerte mit großer Vorsicht zu interpretieren, während die Vergleichbarkeit der Proben untereinander gegeben ist.

Möglicherweise wurden aufgrund der problematischen Kalibrierung generell zu niedrige PA-Gehalte aus den gemessenen Peakflächen berechnet. Daraus können sich auch die oben beschriebenen Gehaltsunterschiede zwischen den Literaturdaten und der vorliegenden Arbeit ergeben.

Interessanterweise kommt das Problem der verdunstenden Stammlösungen in der Literatur nicht zur Sprache. Einige Veröffentlichungen äußern sich gar nicht zum Lösungsmittel für die Standards (Mudge et al. 2015), andere schreiben zumindest für den internen Standard von Stammlösungen in Methanol, ohne jedoch die Änderung der Konzentration zur Sprache zu bringen (Kempf et al. 2008; Liu et al. 2009). Eine mögliche Lösung wäre, die frisch hergestellte Standardlösung zu aliquotieren, zu trocknen und an jedem Arbeitstag ein neues Aliquot frisch in einem definierten Volumen zu lösen.

4.6. Ausblick

Sowohl aus den Ergebnissen der Arbeit, als auch aus den dabei aufgetretenen Problemen und den während der Bearbeitung gewachsenen technischen Möglichkeiten ergeben sich zahlreiche Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen und Experimente.

Die Verfügbarkeit gezielter Methoden zur vollständigen Zerstörung von Genen in Pflanzen (TALEN - *Transcription activator-like effector nucleases* (Stoddard et al. 2016); CRISPR/Cas (Doudna & Charpentier 2014)) ermöglicht eine vollständige Ausschaltung von *HSS* anstelle einer Reduktion auf 30-50 Kopien / 1000 Actin in den besten für diese Arbeit erzeugten Linien. Damit ließe sich feststellen, ob die Nebenreaktion durch *DHS* ein Grundniveau der PA-Biosynthese aufrechterhalten kann und, sofern das der Fall ist, in welchem Umfang. Sollte die Ausschaltung von *HSS* nicht genügen, um die PA-Biosynthese vollständig zu unterdrücken, wäre das zusätzliche Abschalten weiterer Gene sinnvoll. Bisher sind jedoch keine weiteren Gene, die für Enzyme der PA-Biosynthese codieren, aufgeklärt (letzte Suche am 1.2.2019 über PubMed). In der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Dietrich Ober an der Christian-Albrechts-Universität Kiel wird daran gearbeitet. Es gibt erste Kandidaten, deren Funktion jedoch noch nicht eindeutig geklärt werden konnte (Sievert et al. 2015).

Sowohl für die Untersuchung zufällig erzeugter PA-defizienter Linien, als auch für die Charakterisierung von Kulturen für eine biotechnologische Nutzung wären Zahl und Integrationsorte der übertragenen T-DNAs von Interesse. Zur Bestimmung der Kopienzahlen der bis zu drei verschiedenen T-DNAs könnte eine qPCR-Methode

mit einem nur einmal im Genom vorhandenen Referenzgen entwickelt werden (z.B. *ADH*, *GAP3DH* (Duarte et al. 2010)).

Erheblich schwieriger als die Bestimmung der Anzahl der integrierten T-DNAs gestaltet sich die Suche nach den Integrationsorten. Zwar gibt es mittlerweile Methoden zur Sequenzierung der Umgebung eines T-DNA-Inserts, doch die sehr begrenzten Kenntnisse über das Genom von *Symphytum* machen eine Zuordnung zu Genen oder regulatorischen Sequenzen schwierig. Auch aus anderen PA-bildenden Pflanzen sind nur einzelne Gene bekannt, hauptsächlich solche, die für ribosomale RNA codieren, sowie die dazwischenliegenden Sequenzen (*Internal Transcribed Spacer*, ITS). Diese sind für Bestimmung und Systematik von Interesse. Es sind nur wenige Sequenzen von Genen für Enzyme bekannt, beispielsweise RuBisCO im Plastidengenom und aus mehreren Arten auch für HSS und DHS. Eine Zuordnung flankierender Sequenzen von T-DNAs wäre somit nur an Stellen möglich, die hinreichende Homologie zu Pflanzen aufweisen, von denen bereits das Genom sequenziert wurde.

Neben der Möglichkeit einer Steigerung der Produktion erwünschter Substanzen durch Elicitierung und verfahrenstechnische Optimierungen (Zusammensetzung des Mediums, Schüttelfrequenz, Temperatur, Kultivierungsdauer...) ist vor allem eine weitere Bearbeitung der Anzucht von Material und des Animpfens der Flüssigkultur von Interesse. Die Arbeit mit einem einheitlicheren Inokulat könnte die teils starken Schwankungen in der biosynthetischen Aktivität, die zwischen den Versuchsreplikaten beobachtet wurden, verringern.

An der Wirkung von Beinwell sind mehrere Substanzen beteiligt, deren Anteile und Zusammenwirken noch nicht aufgeklärt sind. Die Bestimmung von Allantoin als Leitsubstanz erfasst damit nur einen Teil der wünschenswerten Produktionskapazität einer Kulturlinie oder Vergleichspflanze. Bei einer weiteren Arbeit mit diesem System wäre die Etablierung eines biologischen Testsystems, das die Wirkung (z.B. Wundheilung oder Entzündungshemmung) erfasst, wünschenswert. Analog gilt dies auch für die Übertragung der Strategie auf weitere PA-führende Arzneipflanzen.

5. Zusammenfassung

Beinwell ist eine seit Langem genutzte Arzneipflanze, die unter anderem zu Behandlung von Wunden und Knochenbrüchen eingesetzt wurde. Extrakte aus der Wurzel wirken entzündungshemmend, schmerzlindernd und abschwellend. Die Wirksamkeit wird hauptsächlich den Inhaltsstoffen Allantoin und Rosmarinsäure zugeschrieben. Weitere Bestandteile, wie bestimmte Polysaccharide, sind wahrscheinlich an der Gesamtwirkung beteiligt. Problematisch sind die ebenfalls enthaltenen Pyrrolizidinalkaloide (PA), die in der Leber zu mutagenen und kanzerogenen Stoffwechselprodukten transformiert werden. Diese Stoffe müssen im Extraktionsverfahren entfernt werden. Grenzwerte zur Aufnahme von Pyrrolizidinalkaloiden und Anwendungsbeschränkungen begrenzen den Einsatz von Beinwellprodukten, sodass die Anwendung derzeit nur bei stumpfen Verletzungen wie Zerrungen, Prellungen und Verstauchungen auf intakter Haut erfolgt.

Pyrrolizidinalkaloide kommen in zahlreichen Pflanzen vor, hauptsächlich aus den Familien Asteraceae und Boraginaceae. Darunter sind viele Pflanzen, die als Arzneipflanzen in Gebrauch sind oder waren, neben Beinwell z. B. Pestwurz, Huflattich oder Hundszunge. Die Biosynthese der PA ist bisher nur teilweise aufgeklärt, insbesondere ist wenig über die beteiligten Enzyme bekannt. Der Startpunkt der Biosynthese ist die Bildung von Homospermidin, aus dem über weitere Schritte der Grundkörper der Pyrrolizidinalkaloide, die Necinbase, gebildet wird. Dieser erste Schritt wird durch Homospermidinsynthase (HSS) katalysiert, das bisher einzige bekannte Enzym des Biosyntheseweges.

Ziel der Arbeit war es, Haarwurzelkulturen von Beinwell zu erzeugen, die weniger PA bilden, um Möglichkeiten für die biotechnologische Produktion von Inhaltsstoffen PA-führender Arzneipflanzen auszuloten. Dies sollte durch eine Verringerung der HSS-Menge erreicht werden, um zu überprüfen, ob dieses Enzym ein geeigneter Ansatzpunkt für die Ausschaltung des Biosynthesewegs oder zumindest die Verringerung der PA-Menge ist. Zu diesem Zweck wurden drei verschiedene miRNA-Konstrukte, die gegen die *HSS*-mRNA gerichtet sind, in Wildtyp-*Agrobacterium rhizogenes* eingebracht. Die so erzeugten Klone wurden zur Induktion von Haarwurzeln an *Symphytum*-Blattexplantaten verwendet. Die resultierenden Haarwurzeln wurden mittels PCR auf das Vorhandensein des Konstrukts und der bakteriellen T-DNA überprüft. Es wurden Wachstumsparameter ermittelt. Nach Kultivierung in Schüttelkultur wurden Proben gewonnen, in denen der Gehalt an PA und an Allantoin als Leitsubstanz für die

erwünschten Inhaltsstoffe untersucht wurden. Im selben Material wurde mittels qPCR die Kopienzahl der *HSS*-mRNA erfasst, um einen Vergleich von RNA-Menge und PA-Gehalt zu ermöglichen.

Es wurden Haarwurzeln von zwei Beinwellarten, *Symphytum officinale* und *Symphytum x uplandicum*, hergestellt. Dabei ist erstere die Stammpflanze der Arzneibuchdroge, zweite eine Kreuzung, die aufgrund eines höheren Allantoingehalts wirksamer sein soll. Es zeigte sich, dass sich von *S. officinale* leicht Haarwurzeln erzeugen lassen und diese zumeist gut wachsen. Bei *S. x uplandicum* hingegen war es nur mit zusätzlichen Arbeitsschritten und geringerer Ausbeute möglich, Haarwurzeln zu erzeugen, und diese wuchsen deutlich schlechter. Der Allantoingehalt der *S. x uplandicum*-Haarwurzeln war nicht wesentlich höher als der der *S. officinale*-Haarwurzeln.

Haarwurzeln von *S. officinale* enthielten weniger Allantoin als Beinwellwurzeln, aber mehr als Blätter. Die Linien mit dem höchsten Allantoingehalt wiesen, verglichen mit jenen mit dem niedrigsten, die doppelte Konzentration auf. Es ist ein leichter Trend zu höherem Allantoingehalt in Linien mit geringerem Wachstum erkennbar. Dies führt jedoch nicht zu einer höheren Gesamtausbeute. Der Allantoingehalt wird durch die getesteten Konstrukte nicht beeinflusst.

Es wurden jeweils mehrere Haarwurzellinien mit Wildtyp-Bakterien, Vektorkontrolle und den drei miRNA-Konstrukten hergestellt. Der Einfluss der Konstrukte konnte nicht sicher festgestellt werden, da sowohl unter den miRNA-Linien, als auch unter den Vektorkontrollen zahlreiche Linien eine geringere *HSS*-mRNA-Kopienzahl aufweisen als die Wildtyplinien. Dabei wurden große individuelle Unterschiede zwischen den verschiedenen Linien beobachtet.

In 66 % der untersuchten Proben zeigte sich ein Zusammenhang von *HSS*-Kopienzahl und PA-Gehalt, d.h. in Proben mit hoher Kopienzahl wurde auch ein hoher Alkaloidgehalt gemessen und in solchen mit geringer Kopienzahl ein niedriger. Das spricht dafür, dass die *HSS*-Expression auch quantitativ bedeutsam für die PA-Biosynthese ist. Jedoch konnten weder die *HSS*-mRNA, noch die PA unter die Nachweisgrenze gesenkt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Menge an *HSS*-mRNA sehr wahrscheinlich Einfluss auf das Ausmaß der PA-Biosynthese hat. Das Enzym ist nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ von zentraler Bedeutung. Für eine vollständige Entfernung der PA ist ein Ausschalten von *HSS* anstatt einer Herabregulation notwendig. Sinnvoll ist auch ein kombinierter Ansatz, der auf mehrere Biosyntheseenzyme zielt, sobald weitere aufgeklärt sind.

6. Verzeichnisse

6.1. Abkürzungen

ADH	Alkoholdehydrogenase
amiRNA	künstliche micro- Ribonukleinsäure
bp	Basenpaare
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
gDNA	genomische DNA
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
DHS	Deoxyhypusinsynthase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	DNA abbauendes Enzym
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GAP3DH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GC	Gaschromatigraphie, Gaschromatograph
HPLC	Hochdruck-Flüssigchromatographie
HSS	Homospermidinsynthase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kb	Kilobasen
miRNA	micro- Ribonukleinsäure
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrometer
MSTFA	N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide
PA	Pyrrolizidinalkaloid(e)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PVP	Polyvinylpyrrolidon
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	RNA abbauendes Enzym
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
UV	ultraviolettes Licht
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

6.2. Literatur

- Ahmad VU, Noorwala M, Mohammad FK, Sener B, Gilani AU, Aftab K (1993): "Symphytoxide A , A Triterpenoid Saponin From The Roots Of *Symphytum officinale*." *Phytochemistry* 32: 1003–1006.
- Aird ELH, Hamill JD, Rhodes MJC (1988): "Cytogenetic analysis of hairy root cultures from a number of plant species transformed by *Agrobacterium rhizogenes*." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 15: 47–57.
- Akiyoshi DE, Klee DE, Amasio RM, Nester EW, Gordon MP (1984): "T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 5994–5998.
- Allen RS, Millgate AG, Chitty JA, Thisleton J, Miller JA, Fist AJ, Gerlach WL, Larkin PJ (2004): "RNAi-Mediated Replacement of Morphine with the Nonnarcotic Alkaloid Reticuline in Opium Poppy." *Nature Biotechnology* 22: 1559–1566.
- Anand A, Krichevsky A, Schornack S, Lahaye T, Tzfira T, Tang Y, Citovsky V, Mysore KS (2007): "*Arabidopsis* VIRE2 INTERACTING PROTEIN2 Is Required for *Agrobacterium* T-DNA Integration in Plants." *The Plant Cell Online* 19: 1695–1708.
- Andrès R, Brenneisen R, Clerc JT (1989): "Relating Antiphlogistic Efficacy of Dermatics Containing Extracts of *Symphytum officinale* to Chemical Profiles." *Planta Medica* 55: 643–644.
- Barbakadze V, Mulkijanyan K, Gogilashvili L, Amiranashvili L, Merlani M, Novikova Z, Sulakvelidze M (2009): "Allantoin- and Pyrrolizidine Alkaloids-Free Wound Healing Compositions from *Symphytum asperum*." *Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences* 3: 1–6.
- Bartel DP (2004): "MicroRNAs : Genomics, Biogenesis, Mechanism and Function." *Cell* 116: 281–297.
- Bettany AJE, Dalton SJ, Timms E, Morris P (1998): "Stability of Transgene Expression during Vegetative Propagation of Protoplast-Derived Tall Fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) Plants." *Journal of Experimental Botany* 49: 1797–1804.
- Bollman KM (2003): "HASTY, the Arabidopsis Ortholog of Exportin 5/MSN5, Regulates Phase Change and Morphogenesis." *Development* 130: 1493–1504.
- Böttcher F, Adolph R, Hartmann T (1993): "Homospermidine Synthase, the First Pathway-Specific Enzyme in Pyrrolizidine Alkaloid Biosynthesis." *Phytochemistry* 32: 679–689.

- Buck S, Podevin N, Nolf J, Jacobs A, Depicker A (2009): "The T-DNA Integration Pattern in Arabidopsis Transformants Is Highly Determined by the Transformed Target Cell." *Plant Journal* 60: 134–145.
- Bulgakov VP, Veselova MV, Tchernodet GK, Kiselev KV, Fedoreyev SA, Zhuravlev YN (2005): "Inhibitory Effect of the *Agrobacterium rhizogenes* RolC Gene on Rabdosiin and Rosmarinic Acid Production in *Eritrichium sericeum* and *Lithospermum erythrorhizon* Transformed Cell Cultures." *Planta* 221: 471–478.
- Bulgakov VP (2008): "Functions of Rol Genes in Plant Secondary Metabolism." *Biotechnology Advances* 26: 318–324.
- Bulgakov VP, Aminin DL, Shkryl YN, Gorpenchenko TY, Veremeichik GN, Dimetrenok PS, Zhuravlev YN (2008): "Suppression of Reactive Oxygen Species and Enhanced Stress Tolerance in *Rubia cordifolia* Cells Expressing the RolC Oncogene." *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 1561–1570.
- Bulgakov VP, Shkryl YN, Veremeichik GN (2011): "Application of *Agrobacterium* Rol Genes in Plant Biotechnology: A Natural Phenomenon of Secondary Metabolism Regulation." In *Genetic Transformation*, InTech, Rijeka: 216–271.
- Bulgakov VP, Gorpenchenko TY, Veremeichik GN, Shkryl YN, Tchernodet GK, Bulgakov DV, Aminin DL, Zhuravlev YN (2012): "The RolB Gene Suppresses Reactive Oxygen Species in Transformed Plant Cells through the Sustained Activation of Antioxidant Defense." *Plant Physiology* 158: 1371–1381.
- Bundessortenamt, ed. (2002) *Beschreibende Sortenliste Arznei- und Gewürzpflanzen*. Deutscher Landwirtschaftsverlag GmbH.
- Byrne MC, Koplow J, David C, Tempé J, Chilton M (1983): "Structure of T-DNA in Roots Transformed by *Agrobacterium rhizogenes*." *Journal of molecular and applied genetics* 2: 201–209.
- Chandra S, Chandra R (2011): "Engineering Secondary Metabolite Production in Hairy Roots." *Phytochemistry Reviews* 10: 371–395.
- Chen D, Liu C, Ye H, Li G, Liu B, Meng Y, Chen X (1999): "Ri-Mediated Transformation of *Artemisia Annua* with a Recombinant Farnesyl Diphosphate Synthase Gene for Artemisinin Production." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57: 157–162.
- Chen KY, Liu AY (1997): "Biochemistry and Function of Hypusine Formation on Eukaryotic Initiation Factor 5A." *Biological Signals* 6: 105–109.
- Chen T, Mei N, Fu PP (2010): "Genotoxicity of Pyrrolizidine Alkaloids." *Journal of Applied Toxicology* 30: 183–196.

- Chen X (2005): "MicroRNA Biogenesis and Function in Plants." *FEBS letters* 579: 5923–5931.
- Chezem WR, Clay NK (2016): "Regulation of Plant Secondary Metabolism and Associated Specialized Cell Development by MYBs and BHLHs." *Phytochemistry* 131: 26–43.
- Chintapakorn Y, Hamill JD (2003): "Antisense-mediated down-regulation of putrescine N-methyltransferase activity in transgenic *Nicotiana tabacum* L. can lead to elevated levels of anatabine at the expense of nicotine." *Plant Molecular Biology* 53: 87–105.
- Compton M E, Preece JE (1988): "Effects of Phenolic Compounds on Tobacco Callus and Blackberry Shoot Cultures." *Journal of the American Society of Horticultural Science* 113: 160–163.
- Costantino P, Mauro M, Micheli G, Hooykaas P, Schilperoort R (1981): "Fingerprinting and Sequence Homology of Plasmids from Different Virulent Strains of *Agrobacterium rhizogenes*." *Plasmid* 182: 170–182.
- Cramer L, Beuerle T (2012): "Detection and Quantification of Pyrrolizidine Alkaloids in Antibacterial Medical Honeys." *Planta Medica* 78: 1976–1982.
- Cramer L, Schiebel H, Ernst L, Beuerle T (2013): "Pyrrolizidine Alkaloids in the Food Chain: Development, Validation, and Application of a New HPLC-ESI-MS/MS Sum Parameter Method." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 11382–11391.
- Culvenor CCJ, Tandon HD, eds. (1988): *Environmental Health Criteria 80, Pyrrolizidine Alkaloids*. Geneva: World Health Organization.
- Curtis MD, Grossniklaus U (2003): "A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta." *Plant Physiology* 133: 462–469.
- van Dam NM, Vrieling K (1994): "Genetic Variation in Constitutive and Inducible Pyrrolizidine Alkaloid Levels in *Cynoglossum officinale* L." *Oecologia* 99: 374–378.
- David C, Chilton MD, Tempé J (1984): "Conservation of T-DNA in Plants Regenerated from Hairy Root Cultures." *Biotechnology*: 73–76.
- Dennis R, Dezelak C, Grime J (1987): "Studies on *Symphytum* Species - HPLC Determination of Allantoin." *Acta Pharmaceutica Hungarica* 57: 267–274.
- Diener H C, Rahlfs VW, Danesch U (2004): "The First Placebo-Controlled Trial of a Special Butterbur Root Extract for the Prevention of Migraine: Reanalysis of Efficacy Criteria." *European Neurology* 51: 89–97.
- Dorak MT, ed. (2006): *Real-Time PCR*. Taylor & Francis Group.

- Doran PM, ed. (2013): *Biotechnology of Hairy Root Systems*. Springer, Heidelberg, New York, Dordrecht, London
- Doudna JA, Charpentier E (2014): "Genome Editing. The New Frontier of Genome Engineering with CRISPR-Cas9." *Science* 346: 1077.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987): "A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue." *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
- Dresler S, Szymczak G, Wójcik M (2017): "Comparison of Some Secondary Metabolite Content in the Seventeen Species of the Boraginaceae Family." *Pharmaceutical Biology* 55: 691–695.
- Duarte JM, Wall PK, Edger PP, Landherr LL, Ma H, Leebens-Mack J, DePamphilis CW (2010): "Identification of Shared Single Copy Nuclear Genes in *Arabidopsis*, *Populus*, *Vitis* and *Oryza* and Their Phylogenetic Utility across Various Taxonomic Levels." *BMC evolutionary biology* 10: 61.
- Eastman DF, Dimenna GP, a Segall J (1982): "Covalent Binding of Two Pyrrolizidine Alkaloids, Senecionine and Seneciophylline, to Hepatic Macromolecules and Their Distribution, Excretion and Transfer into Milk of Lactating Mice." *Drug Metabolism & Disposition* 19: 236–240.
- El-Mawla AMAA (2010): "Effect of Certain Elicitors on Production of Pyrrolizidine Alkaloids in Hairy Root Cultures of *Echium rauwolfii*." *Pharmazie* 65: 224–226.
- Filippini F, Rossi R, Morin O, Trovato M, Constantino P, Downey PM, LoSchiavo E, Terzi M (1996): "A Plant Oncogene as Phosphatase." *Nature* 379: 499–500.
- Fu PP, Xia Q, Lin G, Chou MW (2004): "Pyrrolizidine Alkaloids—Genotoxicity, Metabolism Enzymes, Metabolic Activation, and Mechanisms." *Drug Metabolism Reviews* 36: 1–55.
- Georgiev M, Ludwig-Müller J, Alipieva K, Lippert A (2011) "Sonication-Assisted *Agrobacterium rhizogenes*-Mediated Transformation of *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. for Bioactive Metabolite Accumulation." *Plant Cell Reports* 30: 859–866.
- Grąbkowska R, Królicka A, Mielicki W, Wielanek M, Wysonkiska H (2010): "Genetic Transformation of *Harpagophytum procumbens* by *Agrobacterium rhizogenes*: Iridoid and Phenylethanoid Glycoside Accumulation in Hairy Root Cultures." *Acta Physiologiae Plantarum* 32: 665–673.
- Gracza L, Koch H, Löffler E (1985): "Isolierung von Rosmarinsäure aus *Symphytum officinale* und ihre Anti-Inflammatorische Wirksamkeit in einem In-Vitro-Modell." *Archiv der Pharmazie* 318: 1090–1095.

- Grewal SI, Elgin SC (2002): "Heterochromatin: New Possibilities for the Inheritance of Structure." *Current Opinion in Genetics & Development* 12: 178–187.
- Györik S, Stricker H (2009): "Severe Pulmonary Hypertension Possibly Due to Pyrrolizidine Alkaloids in Polyphytotherapy." *Swiss Medical Weekly* 139: 210–211.
- Häkkinen ST, Moyano E, Cusidó RM (2016): "Exploring the Metabolic Stability of Engineered Hairy Roots after 16 Years Maintenance." *Frontiers in Plant Science* 7: 1486.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000): "An RNA-Directed Nuclease Mediates Post-Transcriptional Gene Silencing in *Drosophila* Cells." *Nature* 404: 293–296.
- Hanafy MS, Matter MA, Asker MS, Rady MR (2016): "Production of Indole Alkaloids in Hairy Root Cultures of *Catharanthus Roseus* L. and Their Antimicrobial Activity." *South African Journal of Botany* 105: 9–18.
- Hänsel R, Sticher O, (2007) *Pharmakognosie und Phytopharmazie*. 8. Auflag. Springer Medizin Verlag, Heidelberg
- Hartmann T (1999): "Chemical Ecology of Pyrrolizidine Alkaloids." *Planta* 207: 483–495.
- Hartmann T, Dierich B (1998): "Chemical Diversity and Variation of Pyrrolizidine Alkaloids of the Senecionine Type: Biological Need or Coincidence." *Planta* 206: 443–451.
- Hartmann T, Witte L (1995): "Chemistry, Biology and Chemoecology of the Pyrrolizidine Alkaloids." In *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives Vol. 9*, ed. SW Pelletier. Pergamon, Oxford, 155–233.
- Hashimoto T, Yun D, Yamada Y (1993): "Production of Tropane Alkaloids in Genetically Engineered Root Cultures." *Phytochemistry* 32: 713–718.
- Hattori Y, Uraji M, Suzuki K, Ohta N, Iwata K, Kato A, Yoshida K (2000): "Gene List on a Plant Tumor-Inducing Plasmid, Pti-SAKURA in *Agrobacterium tumefaciens* MAFF301001." *DNA Research* 7: 371–380.
- Hauswald A (2013): "Expressionsanalyse der Homospermidinsynthese sowie Aufnahme von Metabolitenspektren von *Symphytum officinale* und *Symphytum officinale* Hairy Roots." Masterarbeit, Hochschule Lausitz (FH).
- He X, Xia Q, Ma L, Fu PP (2016): "7-Cysteine-Pyrrole Conjugate: A New Potential DNA Reactive Metabolite of Pyrrolizidine Alkaloids." *Journal of Environmental Science and Health* 34: 57–76.

- Heinze M, Brandt W, Marillonnet S, Roos W (2015): “ ‘ Self ’ and ‘ Non-Self ’ in the Control of Phytoalexin Biosynthesis : Plant Phospholipases A2 with Alkaloid-Specific Molecular Fingerprints.” *The Plant Cell* 27: 448–462.
- Hodges LD, Cuperus J, Ream W (2004): “*Agrobacterium rhizogenes* GALLS Protein Substitutes for *Agrobacterium tumefaciens* Single-Stranded DNA-Binding Protein VirE2.” *Journal of Bacteriology* 186: 3065–3077.
- Huang S, Vishwakarma RK, Lee T, Chan H, Tsay H (2014): “Establishment of Hairy Root Lines and Analysis of Iridoids and Secoiridoids in the Medicinal Plant *Gentiana scabra*.” *Botanical Studies* 55: 17.
- Huizing HJ, Pfauth EC, Malingré TM, Sietsma JH (1983): “Regeneration of Plants from Tissue- and Cell Suspension Cultures of *Symphytum officinale* L. and Effect of in Vitro Culture on Pyrrolizidine Alkaloid Production.” *Plant Cell Tissue Organ Culture* 2: 227–238.
- Hutvagner G, Zamore PD (2002): “A MicroRNA in a Multiple- Turnover RNAi Enzyme Complex.” *Science* 297: 2056–2060.
- Jaarsma TA, Lohmanns E, Gadella ETJ, Malingré TM (1989): “Chemotaxonomy of the *Symphytum officinale* Agg. (Boraginaceae).” *Plant Systematics and Evolution* 167: 113–27.
- Jakobsson PJ, Morgenstern R, Mancini J, Ford-Hutchinson A, Persson B (2000): “Membrane-Associated Proteins in Eicosanoid and Glutathione Metabolism (MAPEG).” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161: 20–24.
- Johnson AE, Molyneux RJ, Merrill GB (1985): “Chemistry of Toxic Range Plants. Variation in Pyrrolizidine Alkaloid Content of *Senecio*, *Amsinckia*, and *Crotalaria* Species.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33: 50–55.
- Kempf M, Beuerle T, Bühringer M, Denner M, Trost D, von der Ohe K, Bhavanam VBR, Schreier P (2008): “Pyrrolizidine Alkaloids in Honey: Risk Analysis by Gas Chromatography-Mass Spectrometry.” *Molecular Nutrition & Food Research* 52: 1193–1200.
- Kim HY, Stermitz FR, Coulombe RA (1995): “Pyrrolizidine Alkaloid-Induced DNA-Protein Cross-Links.” *Carcinogenesis* 16: 2691–2697.
- Kim NC, Oberlies NH, Brine DR, Handy RW, Wani MC, Wall ME (2001): “Isolation of Symlandine from the Roots of Common Comfrey (*Symphytum officinale*) Using Countercurrent Chromatography.” *Journal of Natural Products* 64: 251–253.

- Komarnytsky S, Bovisjuk N, Yakoby N, Garvey A, Raskin J (2006): "Cosecretion of Protease Inhibitor Stabilizes Antibodies Produced by Plant Roots." *Plant Physiology* 141: 1185–1193.
- Kopp B, Wawrosch C, Lebada R, Wiedenfeld H (1997): "PA-Freie Huflattichblätter, Teil 1: In-Vitro-Kultivierung Und Selektionszüchtung." *Deutsche Apotheker Zeitung* 137: 4066–4069.
- Kovacova V, Zluvova J, Janousek B, Talinova M, Vyskot B (2014): "The Evolutionary Fate of the Horizontally Transferred Agrobacterial Mikimopine Synthase Gene in the Genera *Nicotiana* and *Linaria*." *PLoS ONE* 9: 1–23.
- Kruse LH, Stegemann T, Sievert C, Ober D (2017) "Identification of a Second Site of Pyrrolizidine Alkaloid Biosynthesis in Comfrey to Boost Plant Defense in Floral Stage." *Plant Physiology* 174: 47–55.
- Kumar R, Vashisth D, Misra A, Akhtar Q, Jalil SU, Shanker K, Gupta MM, Rout PK, Gupta AK, Shasany AK et al. (2016): "RNAi Down-Regulation of Cinnamate-4-Hydroxylase Increases Artemisinin Biosynthesis in *Artemisia Annua*." *Scientific Reports* 6: 26458.
- Kumar SGB, Ganapati TR, Srinivas L, Revathi CJ, Bapat VA (2006): "Expression of Hepatitis B Surface Antigen in Potato Hairy Roots." *Plant Science* 170: 918–925.
- Kurihara Y, Watanabe Y (2004): "From The Cover: *Arabidopsis* Micro-RNA Biogenesis through Dicer-like 1 Protein Functions." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 12753–12758.
- Küster N, Rosahl S, Dräger B (2017): "Potato Plants with Genetically Engineered Tropane Alkaloid Precursors." *Planta* 245: 355–365.
- Laskar MA, Lyngdoh JP, Buam JJ, Syiem D (2005): "Plantlet Regeneration via Adventitious Shoot Bud Proliferation from Leaf Explants in *Potentilla Fulgens* Wall . Ex Hook .— A Plant Possessing Hypoglycemic Activity." *Indian Journal of Biotechnology* 4: 257–260.
- Li FX, Jiu ZP, Zhao DX, Chen LQ, Fu CX, Ma F (2006): "Overexpression of the *Saussurea medusa* Chalcone Isomerase Gene in *S. involucreata* Hairy Root Cultures Enhances Their Biosynthesis of Apigenin." *Phytochemistry* 67: 553–560.
- Liu F, Wan SY, Jiang Z, Li SFY, Ong ES, Osorio JCC (2009): "Determination of Pyrrolizidine Alkaloids in Comfrey by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry." *Talanta* 80: 916–923.

- Livak KJ, Schmittgen TD (2001): "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method." *Methods* 25: 402–408.
- Mahmoud SS, Croteau RB (2001): "Metabolic Engineering of Essential Oil Yield and Composition in Mint by Altering Expression of Deoxyxylulose Phosphate Reductoisomerase and Menthofuran Synthase." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 8915–8920.
- Mahmoud SS, Williams M, Croteau RB (2004): "Cosuppression of Limonene-3-Hydroxylase in Peppermint Promotes Accumulation of Limonene in the Essential Oil." *Phytochemistry* 65: 547–554.
- Mattocks AR (1968): "Toxicity of Pyrrolizidine Alkaloids." *Nature* 217: 723–728.
- Mattocks AR (1971): "Hepatotoxic Effects Due to Pyrrolizidine Alkaloid N-Oxides." *Xenobiotica* 15: 563–565.
- Mattocks AR (1981): "Relation of Structural Features to Pyrrolic Metabolites in Livers of Rats given Pyrrolizidine Alkaloids and Derivatives." *Chemical-Biological Interactions* 35: 301–310.
- Mattocks AR (1982): "Hydrolysis and Hepatotoxicity of Retronecine Diesters." *Toxicology Letters* 14: 111–116.
- Matzke MA, Mette MF, Matzke AJM (2000): "Transgene Silencing by the Host Genome Defense: Implications for the Evolution of Epigenetic Control Mechanisms in Plants and Vertebrates." *Plant Molecular Biology* 43: 401–415.
- Miranda CL, Chung W, Reed RE, Zhao X, Henderson MC, Wang JL, Williams DE (1991): "Flavin-Containing Monooxygenase: A Major Detoxifying Enzyme For the Pyrrolizidine Alkaloid Senecionine in Guinea Pig Tissues." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 178: 546–552.
- Miranda CL, Reed RL, Guengerich FP, Buhler DR (1991): "Role of Cytochrome P450III A4 in the Metabolism of the Pyrrolizidine Alkaloid Senecionine in Human Liver." *Carcinogenesis* 12: 515–519.
- Mishiba KI, Nishihara M, Nakatsuka T, Abe Y, Hirano H, Yokoi T, Kikuchi A, Yamamura S (2005): "Consistent Transcriptional Silencing of 35S-Driven Transgenes in Gentian." *Plant Journal* 44: 541–556.
- Moriguchi K, Maeda Y, Satou M, Hardayani NSN, Kataoka M, Tanaka N, Yoshida K (2001): "The Complete Nucleotide Sequence of a Plant Root-Inducing (Ri) Plasmid Indicates Its Chimeric Structure and Evolutionary Relationship between Tumor-Inducing (Ti) and Symbiotic (Sym) Plasmids in Rhizobiaceae." *Journal of Molecular Biology* 307: 771–784.

- Moriuchi H, Okamoto C, Nishihama R, Yamashita J, Machida Y, Tanaka N (2004): "Nuclear Localization and Interaction of RolB with Plant 14-3-3 Proteins Correlates with Induction of Adventitious Roots by the Oncogene RolB." *Plant Journal* 38: 260–275.
- Mudge EM, Jones AMP, Brown PN (2015): "Quantification of Pyrrolizidine Alkaloids in North American Plants and Honey by LC-MS: Single Laboratory Validation." *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 32: 2068–2074.
- Mütterlein R (1993): "Untersuchungen zum Pyrrolizidinalkaloidgehalt und Pyrrolizidinalkaloidmuster in *Symphytum officinale* L.: Versuche zur Gewinnung pyrrolizidinalkaloidarmer Pflanzen beziehungsweise Pflanzenteile." Dissertation, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg.
- Ncube B, Van Staden J (2015): "Tilting Plant Metabolism for Improved Metabolite Biosynthesis and Enhanced Human Benefit." *Molecules* 20: 12698–12731.
- Niemüller D, Reimann A, Ober D (2012): "Distinct Cell-Specific Expression of Homospermidine Synthase Involved in Pyrrolizidine Alkaloid Biosynthesis in Three Species of the Boraginales." *Plant physiology* 159: 920–929.
- Ober D, Hartmann T (1999): "Homospermidine Synthase, the First Pathway-Specific Enzyme of Pyrrolizidine Alkaloid Biosynthesis, Evolved from Deoxyhypusine Synthase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 14777–14782.
- Osabe K, Harukawa Y, Miura S, Saze H (2017): "Epigenetic Regulation of Intronic Transgenes in Arabidopsis." *Scientific Reports* 7: 45166.
- Osborn A (2010): "Gene Clusters for Secondary Metabolic Pathways: An Emerging Theme in Plant Biology." *Plant Physiology* 154: 531–535.
- Ossowski S, Schwab R, Weigel D (2008): "Gene Silencing in Plants Using Artificial MicroRNAs and Other Small RNAs." *The Plant journal: for Cell and Molecular Biology* 53: 674–90.
- Pan LC, Wilson DW, Lamé MW, Jones AD, Segall HJ (1993): "Cor Pulmonale Is Caused by Monocrotaline and Dehydromonocrotaline, but Not by Glutathione or Cysteine Conjugates of Dihydropyrrolizine." *Toxicology and Applied Pharmacology* 118: 87–97.
- Papp I, Mette MF, Aufsatz W, Daxinger L, Schauer SE, Ray A, van der Winden J, Matzke M, Metzke AJM (2003): "Evidence for Nuclear Processing of Plant Micro RNA and Short Interfering RNA Precursors." *Plant Physiology* 132: 1382–1390.

- Park MH, Joe YA, Kang KR, Lee YB, Wolff EC (1996): "The Polyamine-Derived Amino Acid Hypusine: Its Post-Translational Formation in EIF-5A and Its Role in Cell Proliferation." *Amino Acids* 10: 109–121.
- Park MH, Wolff EC, Folk JE (1993): "Is Hypusine Essential for Eukaryotic Cell Proliferation?" *Trends in Biochemical Sciences* 18: 475–479.
- Pavlov A, Kovatcheva P, Georgiev V, Koleva J, Ilieva M (2002): "Biosynthesis and Radical Scavenging Activity of Betalains during the Cultivation of Red Beet (Beta Vulgaris) Hairy Root Cultures." *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of Biosciences* 57: 640–644.
- Peralta EG, Ream LW (1985): "T-DNA Border Sequences Required for Crown Gall Tumorigenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82: 5112–5116.
- Peterson JE, Jago MV (1980): "Comparison of the Toxic Effects of Dehydroheliotridine and Heliotrine in Pregnant Rats and Their Embryos." *Journal of Pathology* 131: 339–355.
- Petit A, David C, Dahl GA, Ellis JG, Guyon P (1983): "Further Extension of the Opine Concept: Plasmids in *Agrobacterium rhizogenes* Cooperate for Opine Degradation." *MGG Molecular & General Genetics* 190: 204–214.
- Petit A, Berkloff A, Tempé J (1986): "Multiple Transformation of Plant Cells by *Agrobacterium* May Be Responsible for the Complex Organization of T-DNA in Crown Gall and Hairy Root." *Molecular & General Genetics* 202: 388–393.
- Pfaffl MW (2001): "A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR." *Nucleic Acids Research* 29: 16–21.
- Pfister JA, Molyneux RJ, Baker DC (1992) "Pyrrolizidine Alkaloid Content of Houndstongue (*Cynoglossum officinale* L.)." *Journal of Range Management* 45: 254–256.
- Powis G, Ames MM, Kovach JS (1979): "Metabolic Conversion of Indicine N-Oxide to Indicine in Rabbits and Humans." *Cancer Research* 39: 3564–3570.
- Rasenack R, Müller C, Kleinschmidt M, Rasenack J, Wiedenfeld H (2003): "Veno-Occlusive Disease in a Fetus Caused by Pyrrolizidine Alkaloids of Food Origin." *Fetal Diagnosis and Therapy* 18: 223–225.
- Reimann A, Nurhayati N, Backenköhler A, Ober D (2004): "Repeated Evolution of the Pyrrolizidine Alkaloid – Mediated Defense System in Separate Angiosperm Lineages." *The Plant Cell* 16: 2772–2784.
- Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP (2002): "MicroRNAs in Plants." *Genes & Development* 16: 1616–1626.

- Renouard S, Corbin C, Drouet S, Medvedec B, Doussot J, Colas C, Mannit B, Bhambra AS, Gontier E, Jullian N, Mesnard F, Boitel M, Abbasi BH, Arroo RRJ, Lainé E, Hano C (2018): "Investigation of *Linum flavum* (L.) Hairy Root Cultures for the Production of Anticancer Aryltetralin Lignans." *International Journal of Molecular Sciences* 19: 990.
- Rieker AJ, Banfield WM, Wright WH, Keitt HE, Sagen GW (1930): "Studies on Infectious Hairy Root of Nursery Apple Trees." *Journal of Agricultural Research* 41: 507–540.
- Rode D (2002): "Comfrey Toxicity Revisited." *Trends in Pharmacological Sciences* 23: 497–499.
- Röder E (1995): "Medicinal Plants in Europe Containing Pyrrolizidine Alkaloids." *Die Pharmazie* 50: 83–98.
- Röder E, Wiedenfeld H, Jost EJ (1981): "Tussilagin - Ein Neues Pyrrolizidinalkaloid Aus *Tussilago farfara*." *Planta Medica* 43: 99–102.
- Roitsch T, Wang H, Shouguang J, Nester EW (1990): "Mutational Analysis of the VirG Protein, a Transcriptional Activator of *Agrobacterium tumefaciens* Virulence Genes." *Journal of Bacteriology* 172: 6054–6060.
- Rothmaler W (2002): *Exkursionsflora von Deutschland, Band 2 Gefäßpflanzen: Grundband*. 18. Aufl. eds. EJ Jäger, K Werner. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin
- Roulet M, Laurini R, Rivier L, Calame A (1988) "Hepatic Veno-Occlusive Disease in Newborn Infant of a Woman Drinking Herbal Tea." *Journal of Pediatrics* 112: 433–436.
- Sampaio BL, Edrada-Ebel R, Da Costa FB (2016): "Effect of the Environment on the Secondary Metabolic Profile of *Tithonia diversifolia*: A Model for Environmental Metabolomics of Plants." *Scientific Reports* 6: 29265.
- Sawada H, Ieki H, Matsuda I (1995): "PCR Detection of Ti and Ri Plasmids from Phytopathogenic *Agrobacterium* Strains." *Applied and Environmental Microbiology* 61: 828–831.
- Scheiffele P, Pansegrau W, Lanka E (1995): "Initiation of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA Processing: Purified Proteins VirD1 and VirD2 Catalyze Site- and Strand-Specific Cleavage of Superhelical t-Border DNA in Vitro." *Journal of Biological Chemistry* 270: 1269–1276.
- Schröder G, Lanka E (2005): "The Mating Pair Formation System of Conjugative Plasmids—A Versatile Secretion Machinery for Transfer of Proteins and DNA." *Plasmid* 54: 1–25.

- Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D (2006): "Highly Specific Gene Silencing by Artificial MicroRNAs in Arabidopsis." *The Plant Cell* 18: 1121–1133.
- Schwab R (2007): "Gene Silencing in Plants Using Artificial MicroRNAs and Other Small RNAs Protocol : Cloning of Artificial MicroRNAs."
- Schwartz E, Steinbüchel A, (2009) 11. Auflag. *Microbial Megaplasמידs*. Springer, Heidelberg
- Schwarz DS, Hutvágner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003): "Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex." *Cell* 115: 199–208.
- Sidwa-Gorycka M, Krolicka A, Orlita A, Malinski E, Golebiowski M, Kumirska J, Chromik A, Biskup E, Stepnowski P, Lojkowska E (2009): "Genetic Transformation of *Ruta Graveolens* L. by *Agrobacterium rhizogenes*: Hairy Root Cultures a Promising Approach for Production of Coumarins and Furanocoumarins." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 97: 59–69.
- Sievert C, Beuerle T, Hollmann J, Ober D (2015): "Single Cell Subtractive Transcriptomics for Identification of Cell-Specifically Expressed Candidate Genes of Pyrrolizidine Alkaloid Biosynthesis." *Phytochemistry* 117: 17–24.
- Simpson RB, Spielmann A, Margossian L, McKnight TD (1986) "A Disarmed Binary Vector from *Agrobacterium tumefaciens* Functions in *Agrobacterium Rhizogenes*." *Plant Molecular Biology* 6: 403–415.
- Sinkar VP, White FF, Gordon MP (1987): "Molecular Biology of Ri-Plasmid—A Review." *Journal of Biosciences* 11: 47–57.
- Smith LW, Culvenor CCJ (1981): "Plant Sources of Hepatotoxic Pyrrolizidine Alkaloids." *Journal of Natural Products* 44: 129–152.
- Sperl W, Stuppner H, Gassner I, Judmaier W, Dietze O, Vogel W (1995): "Reversible Hepatic Veno-Occlusive Disease in an Infant after Consumption of Pyrrolizidine-Containing Herbal Tea." *European Journal of Pediatrics* 154: 112–116.
- Stachel SE, Zambryski PC (1986): "VirA and VirG Control the Plant-Induced Activation of the T-DNA Transfer Process of *A. tumefaciens*." *Cell* 46: 325–333.
- Staiger C (2012): "Comfrey: A Clinical Overview." *Phytotherapy Research* 26: 1441–1448.
- Stengl P, Wiedenfeld H, Röder E (1982): "Lebertoxische Pyrrolizidinalkaloide in *Symphytum*-Präparaten." *Deutsche Apotheker Zeitung* 122: 851–855.

- Stoddard TJ, Clasen BM, Baltes NJ, Demorest ZL (2016): "Targeted Mutagenesis in Plant Cells through Transformation of Sequence-Specific Nuclease mRNA." *PLoS one* 11: e0154634.
- Stuppner H, Sperl W, Gassner I, Vogel W (1992): "Verwechslung von *Tussilago farfara* mit *Petasites hybridus*—ein Aktueller Fall von Pyrrolizidinalkaloid-Intoxikation." *Scientia Pharmaceutica* 60: 160.
- Sundberg S, Meek L, Carroll K, Das A, Ream W (1996): "VirE1 Protein Mediates Export of the Single-Stranded DNA-Binding Protein VirE2 from *Agrobacterium tumefaciens* into Plant Cells." *Journal of Bacteriology* 178: 1207–1212.
- Suzuki K, Tanaka K, Yamamoto S, Kiyokawa K, Moriguchi K, Yoshida K (2009): "Ti and Ri Plasmids." in *Microbial Megaplasmids*, ed. E Schwartz. Springer Berlin Heidelberg, 133–147.
- Tepfer D (1984): "Transformation of Several Species of Higher Plants by *Agrobacterium rhizogenes*: Sexual Transmission of the Transformed Genotype and Phenotype." *Cell* 37: 959–967.
- Tukey JW (1994): *Exploratory Data Analysis*. 18. Auflag. ed. F Mosteller. Addison-Wesley Publishing Company.
- Tzfira T, Vaidya M, Citovsky V (2001): "VIP1, an *Arabidopsis* Protein That Interacts with *Agrobacterium* VirE2, Is Involved in VirE2 Nuclear Import and *Agrobacterium* Infectivity." *EMBO Journal* 20: 3596–3607.
- Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007): "Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation." *Science* 318: 1931–1934.
- White FF, Taylor BH, Huffman GA, Gordon MP, Nester EW (1985): "Molecular and Genetic Analysis of the Transferred DNA Regions of the Root-Inducing Plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*." *Journal of bacteriology* 164: 33–44.
- Wichtl M, (2002) *Teedrogen und Phytopharmaka*. 4. Auflag. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart
- Wiedenfeld H (1997): "PA-Freie Huflattichblätter, Teil 2: Analytik Der Pyrrolizidinalkaloide." *Deutsche Apotheker Zeitung* 137: 4070–4075.
- Willmitzer L, Sanchez-Serrano J, Buschfeld E, Schell J (1982): "DNA from *Agrobacterium Rhizogenes* in Transferred to and Expressed in Axenic Hairy Root Plant Tissues." *MGG Molecular & General Genetics* 186: 16–22.
- Winter CK, Segall HJ (1989): "Metabolism of Pyrrolizidine Alkaloids." In *Toxicants of Plant Origin, Volume I, Alkaloids*, ed. PR Cheeke. CRC Press, Boca Raton: 23–40.

- Wuilloud JCA, Gratze SR, Gamble BM, Wolnik KA (2004): "Simultaneous Analysis of Hepatotoxic Pyrrolizidine Alkaloids and N-Oxides in Comfrey Root by LC-Ion Trap Mass Spectrometry." *The Analyst* 129: 150–156.
- Xia Q, Chou MW, Kadulbar FF, Chan PC, Fu PP (2003): "Human Liver Microsomal Metabolism and DNA Adduct Formation of the Tumorigenic Pyrrolizidine Alkaloid, Riddelliine." *Chemical Research in Toxicology* 16: 66–73.
- Yadav NS, Vanderleyden J, Bennett DR, Barnes WM, Chilton MD (1982): "Short Direct Repeats Flank the T-DNA on a Nopaline Ti Plasmid." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79: 6322–6326.
- Yang L, Wen K, Ruan X, Zhao Y, Wei F, Wang Q (2018): "Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors." *Molecules* 23: 762.
- Yang YC, Yan J, Doerge DR, Chan PC, Fu PP, Chou HW (2001): "Metabolic Activation of the Tumorigenic Pyrrolizidine Alkaloid, Riddelliine, Leading to DNA Adduct Formation in Vivo." *Chemical Research in Toxicology* 14: 101–109.
- Young JM, Kuykendall LD, Martinez-Romero E, Kerr A, Sawada H (2001): "A Revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an Emended Description of the Genus, and the Inclusion of All Species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium* Undicola de Lajudie et Al. 1998 as New Combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 89–103.
- Zaidi ZR, Sena FJ, Basilio CP (1982): "Stability Assay of Allantoin in Lotions and Creams by High-Pressure Liquid Chromatography." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 71: 997–999.
- Zambryski P, Tempé J, Schell J (1989): "Transfer and Function of T-DNA Genes from *Agrobacterium* Ti-Plasmid and Ri-Plasmid in Plants." *Cell* 56: 193–201.
- Zhu J, Oger PM, Schrammeijer B, Hooykaas PJJ, Farrand SK, Winans SC (2000): "The Bases of Crown Gall Tumorigenesis." *Journal of Bacteriology* 182: 3885–3895.

6.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beinwell im Gewächshaus	1
Abbildung 2: Allantoin.....	2
Abbildung 3: Rosmarinsäure	2
Abbildung 4: Retronecin	4
Abbildung 5: Retronecin-N-Oxid.....	4
Abbildung 6: Strukturen von Pyrrolizidinalkaloiden.....	4
Abbildung 7: Phase I Metabolismus von Pyrrolizidinalkaloiden.....	6
Abbildung 8: Reaktionen von Pyrrolestern <i>in vivo</i>	7
Abbildung 9: Biosynthesereaktionen durch HSS und DHS.	10
Abbildung 10: Blattexplantat und Haarwurzeln von <i>S. officinale</i>	11
Abbildung 11: Schematische Übersicht eines Virulenzplasmids von <i>Agrobacterium</i>	13
Abbildung 12: Wirkung verschiedener Konzentrationen von Hygromycin B auf Wildtyp-Haarwurzeln.	24
Abbildung 13: Genregulation mit künstlicher microRNA.	29
Abbildung 14: cDNA von <i>HSS</i> aus <i>Symphytum officinale</i> mit den Bindestellen der künstlichen miRNAs	30
Abbildung 15: Plasmidkarte von pMDC 32. Darstellung des verwendeten Zielpasmids.	31
Abbildung 16: Plasmidkarte von pALmiRhss2.	32
Abbildung 17: Plasmidkarte von pMDC32-0.	33
Abbildung 18: Kalibrierung für die Quantifizierung mittels qPCR von <i>Actin</i>	45
Abbildung 19: Kalibrierung für die Quantifizierung mittels qPCR von <i>HSS</i>	45
Abbildung 20: Peakfläche bei verschiedenen Allantoinkonzentrationen nach Trennung mittels HPLC und Detektion der Absorption bei 206 nm.	48
Abbildung 21: Kalibriergerade für Allantoin.....	48
Abbildung 22: Derivatisierung der Pyrrolizidinalkaloide während der Probenaufbereitung.....	50
Abbildung 23: Kalibriergerade Retronecin.	52
Abbildung 24: Schema Kulturerzeugung.	55
Abbildung 25: Übersicht zur Probengewinnung und-Analyse..	56
Abbildung 26: Pflanzen aus Haarwurzeln.	57
Abbildung 27: Beinwellpflanze mit und ohne <i>rol</i> -Gene.....	58
Abbildung 28: Test auf Hygromycinresistenz.....	59

Abbildung 29: Wachstum von Haarwurzelkulturen auf MS-Agar.....	62
Abbildung 30: Längenzuwachs von Haarwurzeln nach acht Tagen.	63
Abbildung 31: Anteil der verzweigten Haarwurzeln nach fünf Tagen.	65
Abbildung 32: Trockenmasse nach 14 Tagen in Flüssigkultur (Kontrollen).	67
Abbildung 33: Trockenmasse nach 14 Tagen in Flüssigkultur (Linien mit miRNA-Konstrukten).....	67
Abbildung 34: Bestimmung der PCR-Effizienz für die q_SO_Actin_201-Primer.	68
Abbildung 35: Abweichung der HSS-Expression vom Mittelwert bei <i>S. officinale</i> -Wildtyp-Haarwurzeln.	70
Abbildung 36: Expression von <i>DHS</i> im Probensatz A (Kontrollen).....	72
Abbildung 37: Expression von <i>DHS</i> im Probensatz A (Linien mit miRNA-Konstrukten).....	72
Abbildung 38: Expression von <i>DHS</i> in ausgewählten Proben.....	73
Abbildung 39: Expression von <i>HSS</i> im Probensatz A (Kontrollen).	74
Abbildung 40: Expression von <i>HSS</i> im Probensatz A (Linien mit miRNA-Konstrukten).....	74
Abbildung 41: Expression von <i>HSS</i> in ausgewählten Proben (Mittelwerte).....	75
Abbildung 42: Expression von <i>HSS</i> in ausgewählten Proben (einzelne Replikate).	76
Abbildung 43: Expression von <i>HSS</i> nach Gruppen von Kulturlinien.	76
Abbildung 44: Retentionszeit von Allantoin.....	78
Abbildung 45: Chromatogramm des Extrakts dicker, > 1 Jahr alter Wurzeln von <i>S. officinale</i>	79
Abbildung 46: Chromatogramm eines Extrakts von <i>S. officinale</i> Haarwurzeln...	79
Abbildung 47: Peakfläche in Abhängigkeit von der Extraktionszeit.	80
Abbildung 48: Allantoingehalt in Beinwellpflanzen.	81
Abbildung 49: Allantoingehalt in Haarwurzeln (Kontrollen).	82
Abbildung 50: Allantoingehalt in Haarwurzeln (Linien mit miRNA-Konstrukten).	82
Abbildung 51: Allantoingehalt in Haarwurzeln in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer.....	83
Abbildung 52: Chromatogramm der PA-Standards.....	85
Abbildung 53: Massenspektrum Retronecin / Heliotridin (im Messbereich).....	86
Abbildung 54: Massenspektrum Retronecin / Heliotridin (überladen).....	86
Abbildung 55: Gehalt an Pyrrolizidinalkaloiden in Beinwellpflanzen.....	88
Abbildung 56: Gehalt an Pyrrolizidinalkaloiden in Haarwurzeln im Probensatz A (Kontrollen).....	89

Abbildung 57: Gehalt an Pyrrolizidinalkaloiden in Haarwurzeln im Probensatz A (Linien mit miRNA-Konstrukten).	90
Abbildung 58: Gehalt an Pyrrolizidinalkaloiden in ausgewählten Proben von Haarwurzelkulturen (Mittelwerte).	91
Abbildung 59: Gehalt an Pyrrolizidinalkaloiden in ausgewählten Proben von Haarwurzelkulturen (einzelne Replikate).	92
Abbildung 60: Zusammenhang von <i>HSS</i> -Expression und Alkaloidgehalt (vollständiger Datensatz).	93
Abbildung 61: Häufigkeitsverteilung der Abstände von Genexpression und PA-Gehalt.	94
Abbildung 62: Zusammenhang von <i>HSS</i> -Expression und Alkaloidgehalt (reduzierter Datensatz).	94
Abbildung 63: Zuwachs der Wurzellänge von Haarwurzeln nach acht Tagen (<i>S. x uplandicum</i> -Linien und <i>S. officinale</i> -Kontrollen).	134
Abbildung 64: Zuwachs der Wurzellänge von Haarwurzeln nach acht Tagen (<i>S. officinale</i> -Linien mit miRNA-Konstrukten).	134
Abbildung 65: Verzweigungen nach fünf Tagen (<i>S. x uplandicum</i> -Linien und <i>S. officinale</i> -Kontrollen).	135
Abbildung 66: Verzweigungen nach fünf Tagen (<i>S. officinale</i> -Linien mit miRNA-Konstrukten).	135
Abbildung 67: Chromatogramm des Extrakts eines kleinen Blattes von <i>S. officinale</i>	136
Abbildung 68: Chromatogramm des Extrakts eines kleinen Blattes von <i>S. officinale</i>	136
Abbildung 69: Chromatogramm des Extrakts eines großen Blattes von <i>S. officinale</i>	137
Abbildung 70: Chromatogramm des Extrakts feiner Wurzeln von <i>S. officinale</i>	137
Abbildung 71: Chromatogramm eines Extrakts von bei Licht kultiviertem <i>S. officinale</i> Kallus.	138
Abbildung 72: Chromatogramm eines Extrakts von bei Dunkelheit kultiviertem <i>S. officinale</i> Kallus.	138
Abbildung 73: Chromatogramm des Extrakts eines kleinen Blattes von <i>S. officinale</i>	139
Abbildung 74: Chromatogramm des Extrakts eines mittleren Blattes von <i>S. officinale</i>	139
Abbildung 75: Chromatogramm des Extrakts eines großen Blattes von <i>S. officinale</i>	140

Abbildung 76: Chromatogramm des Extrakts aus feinen Wurzeln von <i>S. officinale</i> .	140
Abbildung 77: Chromatogramm des Extrakts aus mittleren Wurzeln von <i>S. officinale</i> .	141
Abbildung 78: Chromatogramm des Extrakts aus dicken Wurzeln von <i>S. officinale</i> .	141
Abbildung 79: Chromatogramm eines Extrakts von <i>S. officinale</i> Haarwurzeln (SOHR-14).	142
Abbildung 80: Chromatogramm eines Extrakts von <i>S. officinale</i> Haarwurzeln (SOHR-17).	142
Abbildung 81: Chromatogramm eines Extrakts von bei Licht kultiviertem <i>S. officinale</i> Kallus.	143
Abbildung 82: Chromatogramm eines Extrakts von bei Dunkelheit kultiviertem <i>S. officinale</i> Kallus.	143

6.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte	18
Tabelle 2: Bezugsquellen spezieller Chemikalien	19
Tabelle 3: Medien zur Anzucht der verwendeten Organismen	20
Tabelle 4: Lösungen und Medienzusätze für die Erzeugung von Haarwurzelkulturen	21
Tabelle 5: Medienzusätze für die Transformation	27
Tabelle 6: Verwendete künstliche Micro-RNAs	30
Tabelle 7: Puffer und Lösungen für die molekularbiologischen Arbeiten	33
Tabelle 8: Primer für qualitative PCR-Untersuchungen	39
Tabelle 9: Primer für die quantitative PCR	42
Tabelle 10: Lösungen für die Extraktion und Derivatisierung der Pyrrolizidinalkaloide	50
Tabelle 11: Alkaloidgemische für die Bestimmung der Peakfläche des internen Standards	53
Tabelle 12: Peakfläche Heliotrin	53
Tabelle 13: Ermittlung des Korrekturfaktors	54
Tabelle 14: Transformationseffizienz	60
Tabelle 15: Gesamtübersicht der bestätigten und weiterkultivierten Haarwurzelkulturen	60

Tabelle 16: Berechnete relative Regulation der <i>DHS</i> -Expression in Abhängigkeit von der verwendeten Formel.....	70
Tabelle 17: Erntemasse und Allantoingehalt in ausgewählten Haarwurzellinien.	84
Tabelle 18: PA-Gehalte nach Gruppen von Haarwurzellinien.	90
Tabelle 19: PA-Gehalt und <i>HSS</i> -Kopienzahl der Haarwurzelproben.	144

7. Anhang

7.1. Längenwachstum von Haarwurzeln

Einzeldarstellung der untersuchten Linien.

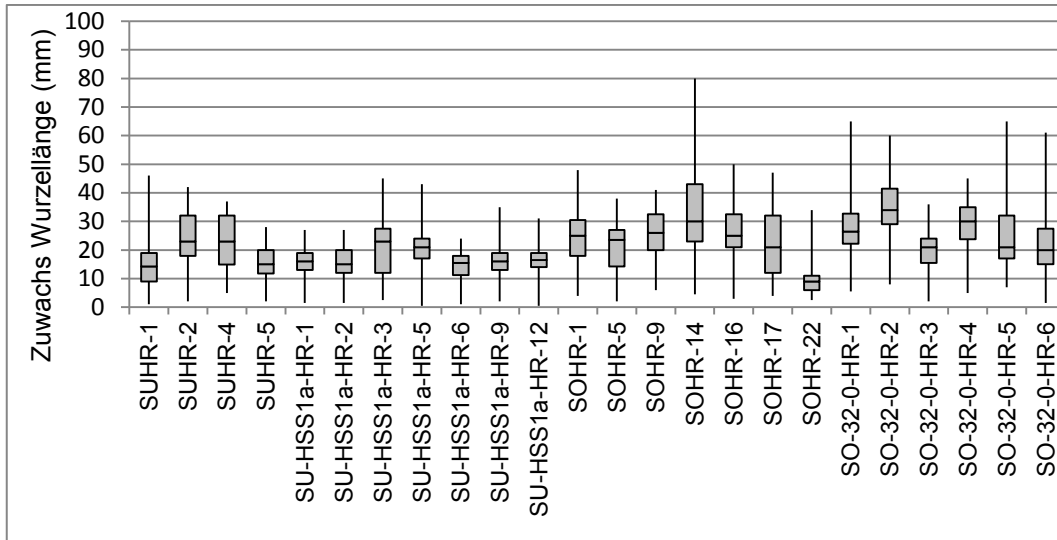


Abbildung 63: Zuwachs der Wurzellänge von Haarwurzeln nach acht Tagen (*S. x uplandicum*-Linien und *S. officinale*-Kontrollen). Dargestellt sind die Daten aus drei unabhängigen Versuchsansätzen. Die Zahl der Wurzelspitzen pro Linie lag bei 40-60 (SU-HSS1a-HR-5: n=33).

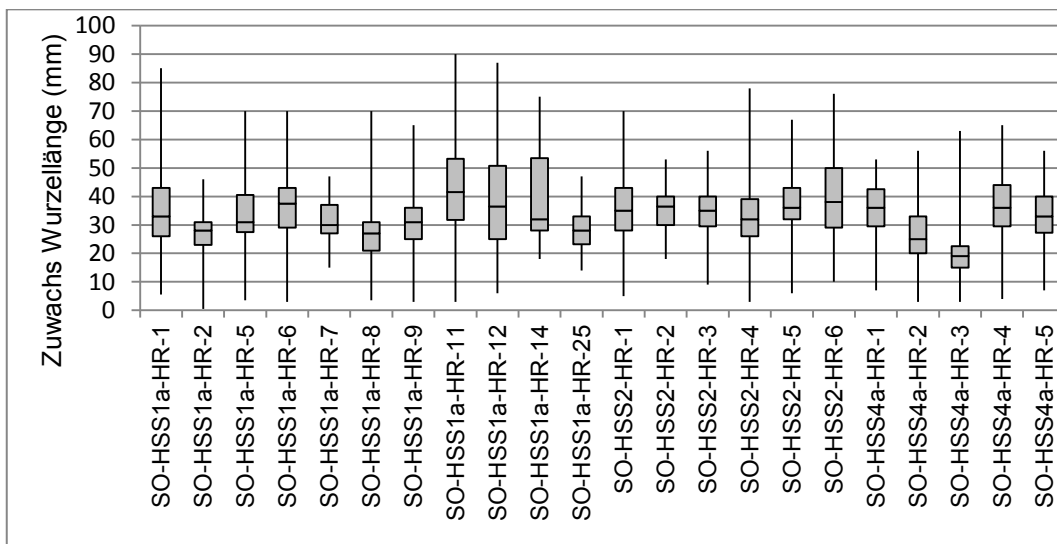


Abbildung 64: Zuwachs der Wurzellänge von Haarwurzeln nach acht Tagen (*S. officinale*-Linien mit miRNA-Konstrukten). Dargestellt sind die Daten aus drei unabhängigen Versuchsansätzen. Die Zahl der Wurzelspitzen pro Linie lag bei 50-60 (SO-HSS4a-HR-1: n=42).

Bildung von Seitenwurzeln / Verzweigung von Haarwurzeln; Einzeldarstellung der untersuchten Linien

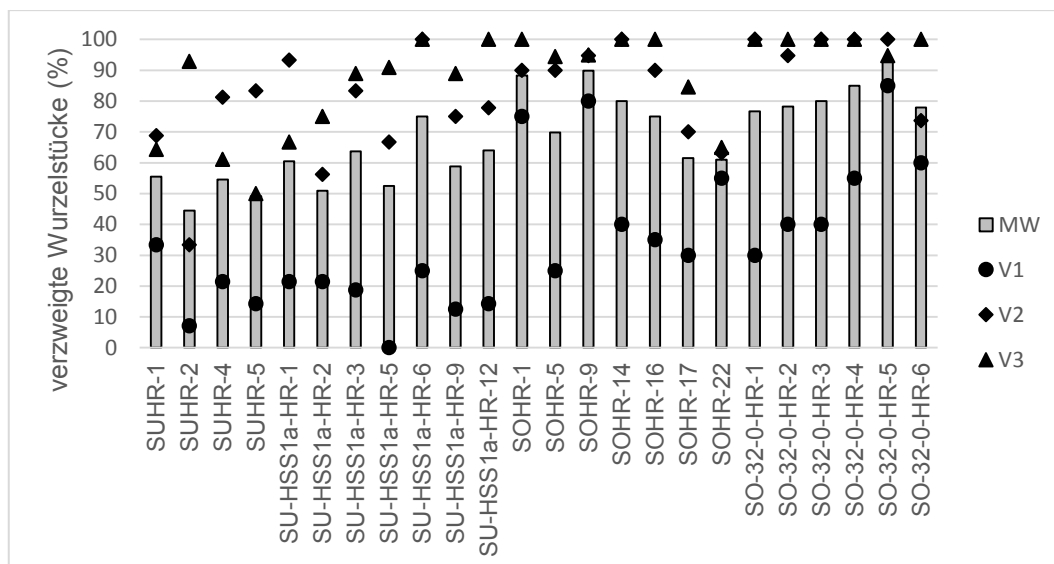


Abbildung 65: Verzweigungen nach fünf Tagen (*S. x uplandicum*-Linien und *S. officinale*-Kontrollen). Die Abbildung zeigt welcher Prozentuale Anteil der Wurzelstücken nach fünf Tagen mindestens eine Seitenwurzel gebildet hat. Dabei stellt der graue Balken (MW) den Mittelwert aus allen drei Versuchsansätzen dar, während die Punktmarkierungen (V1-V3) die einzelnen Datensätze der drei Versuche repräsentieren.

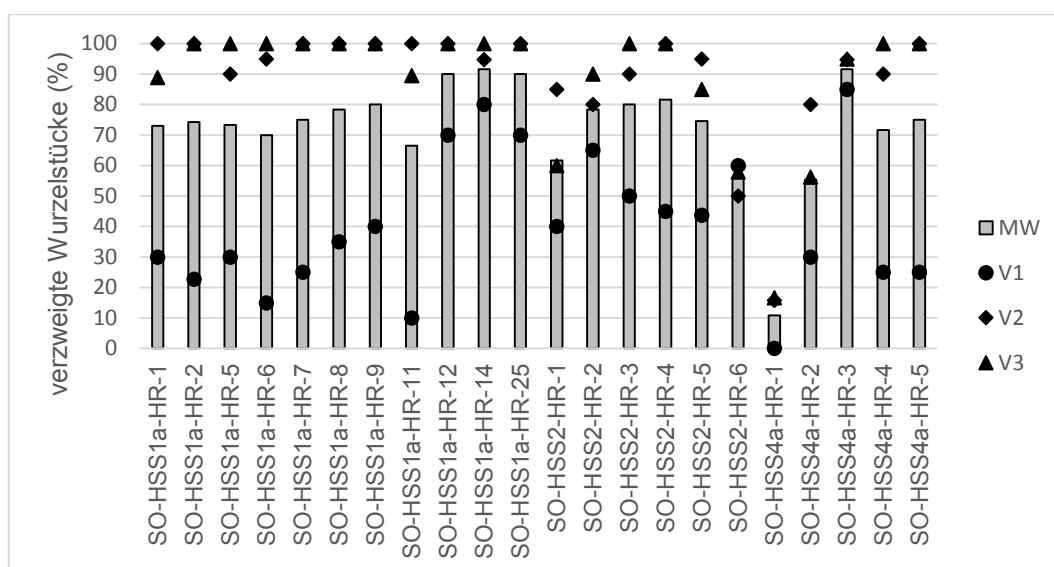


Abbildung 66: Verzweigungen nach fünf Tagen (*S. officinale*-Linien mit miRNA-Konstrukten). Die Abbildung zeigt welcher Prozentuale Anteil der Wurzelstücken nach fünf Tagen mindestens eine Seitenwurzel gebildet hat. Dabei stellt der graue Balken (MW) den Mittelwert aus allen drei Versuchsansätzen dar, während die Punktmarkierungen (V1-V3) die einzelnen Datensätze der drei Versuche repräsentieren.

7.2. Bestimmung des Allantoingehalts mittels HPLC

Typische Chromatogramme bei der Allantoinbestimmung mittels HPLC

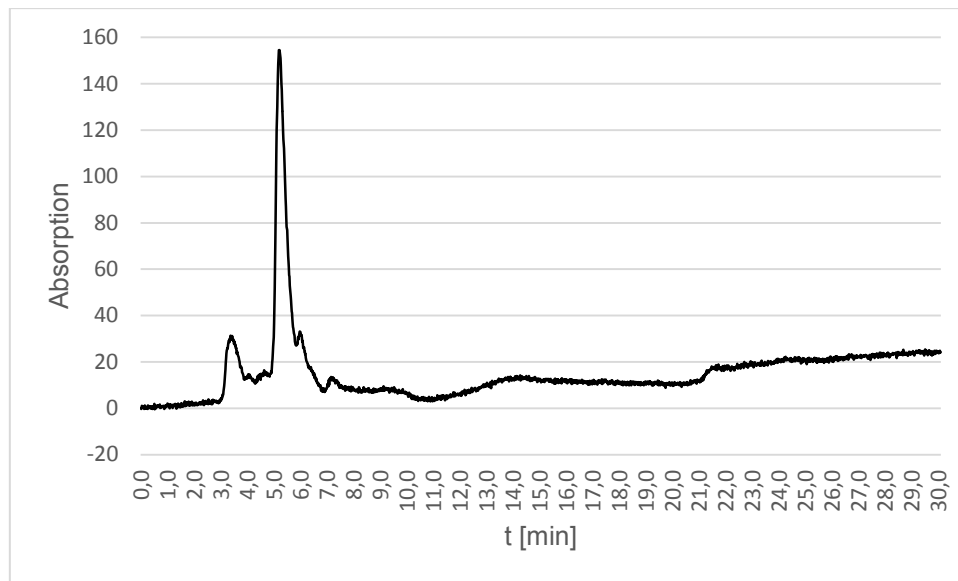


Abbildung 67: Chromatogramm des Extrakts eines kleinen Blattes von *S. officinale*.
Die Probe wurde im März gesammelt. Allantoin eluierte nach 5,2 min

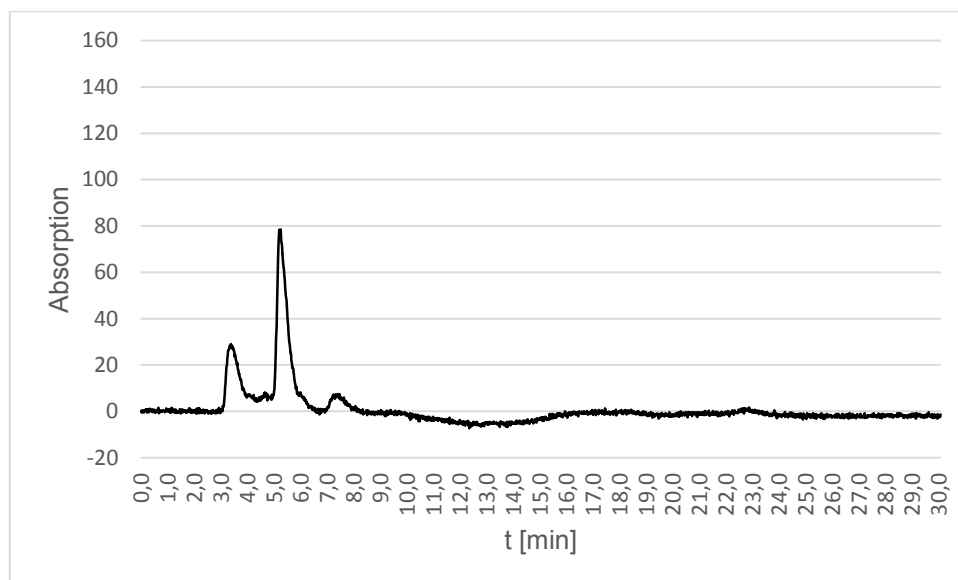


Abbildung 68: Chromatogramm des Extrakts eines kleinen Blattes von *S. officinale*.
Die Probe wurde im Juli gesammelt. Allantoin eluierte nach 5,2 min

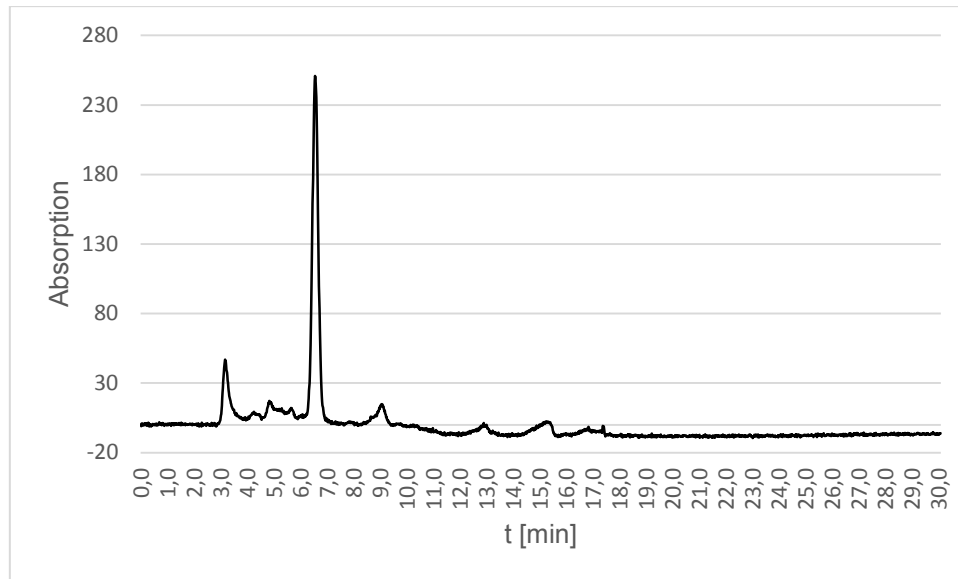


Abbildung 69: Chromatogramm des Extrakts eines großen Blattes von *S. officinale*. Allantoin wäre in dieser Meßreihe bei 6,0 min zu erwarten gewesen. Der deutliche Peak erscheint zu spät. Die automatische Integration der Auswertungssoftware fand um 6 min keinen Peak, sodaß für diese Probe auf ein Fehlen von Allantoin oder einen Gehalt unter der Nachweisgrenze geschlossen wurde.

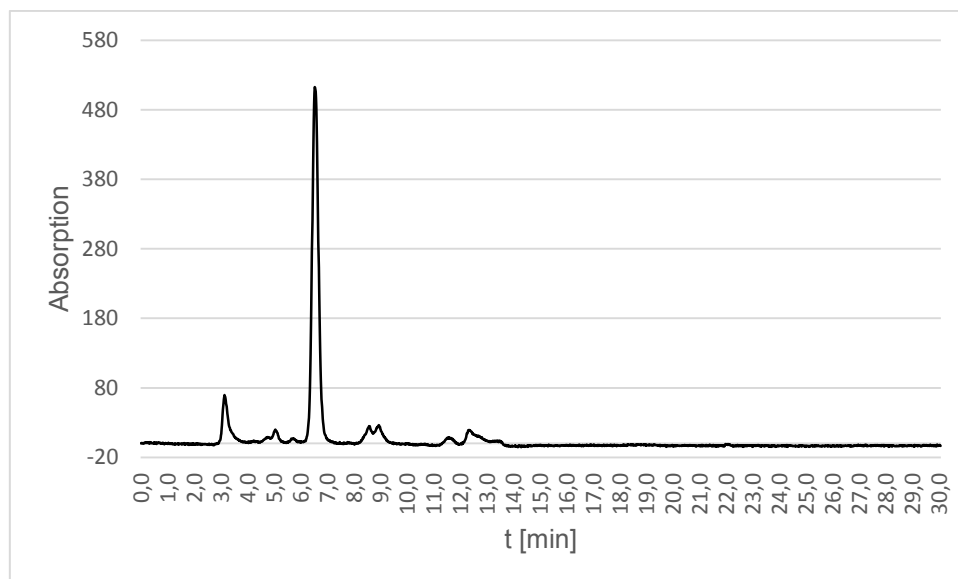


Abbildung 70: Chromatogramm des Extrakts feiner Wurzeln von *S. officinale*. Aufgrund der Daten des externen Standards in der Meßreihe wurde Allantoin bei 5,9-6,0 min erwartet. Zu dieser Zeit wurde kein Peak detektiert.

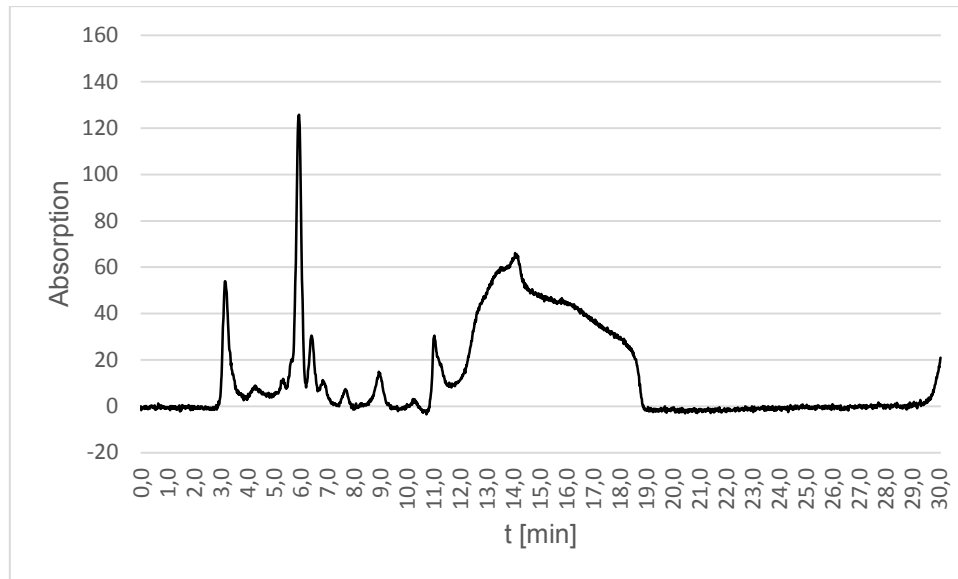


Abbildung 71: Chromatogramm eines Extrakts von bei Licht kultiviertem *S. officinale* Kallus. Allantoin eluierte bei 5,9 min.

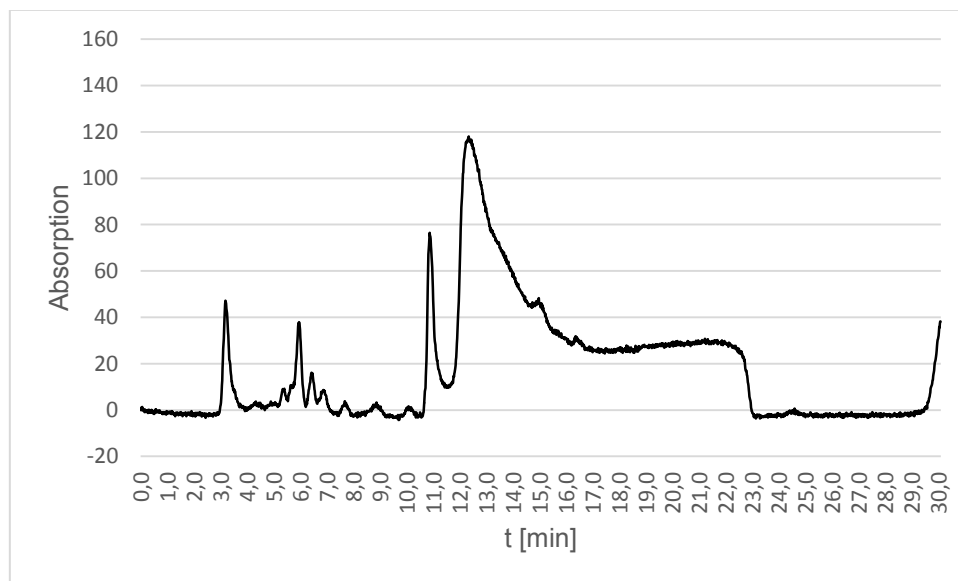


Abbildung 72: Chromatogramm eines Extrakts von bei Dunkelheit kultiviertem *S. officinale* Kallus. Allantoin eluierte bei 5,9 min (selbe Meßreihe wie **Abbildung 71).**

7.3. Bestimmung des PA-Gehalts mit GC-MS

Typische Chromatogramme der gaschromatographischen Analyse von Pyrrolizidinalkaloiden. Geringe Verschiebungen der Retentionszeiten im Verlauf der Arbeiten resultierten aus dem Kürzen der GC-Säule sowie dem später erfolgten Einbau einer neuen Säule. Heliotridin erschien stets etwa eine halbe Minute später als Retronecin.

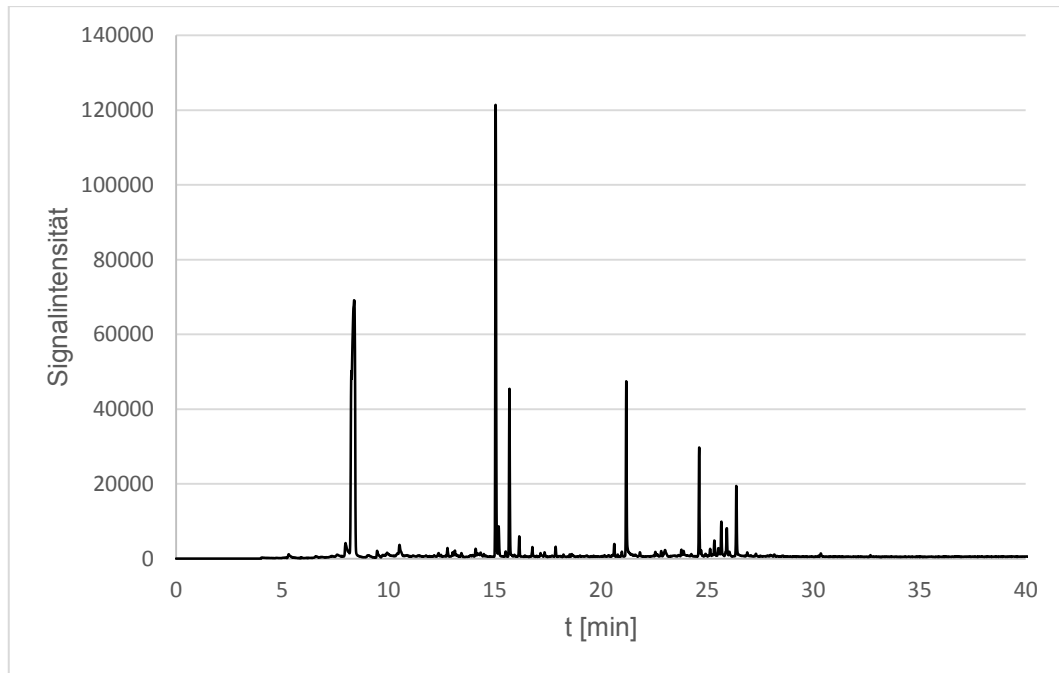


Abbildung 73: Chromatogramm des Extrakts eines kleinen Blattes von *S. officinale*. Die Probe wurde 1:10 mit Essigsäureethylester verdünnt. Retronecin eluierte bei 15,0 min (Peakfläche 333.757), der Standard Heliotridin bei 15,7 min (Peakfläche 111.374).

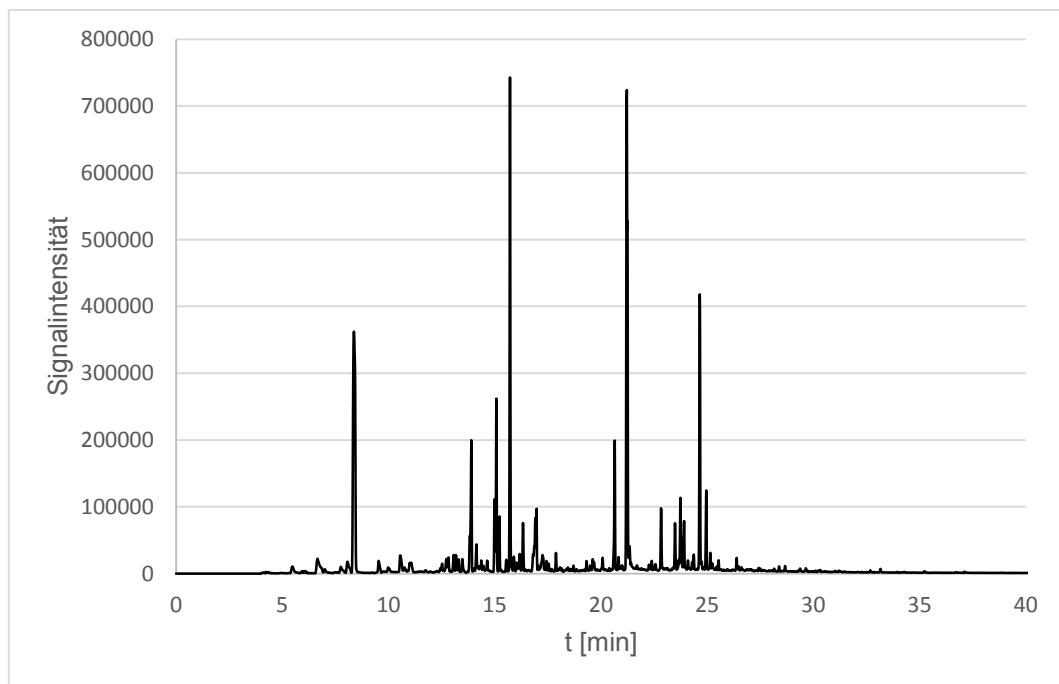


Abbildung 74: Chromatogramm des Extrakts eines mittleren Blattes von *S. officinale*. Retronecin eluierte bei 15,1 min (Peakfläche 593.174), der Standard Heliotridin bei 15,7 min (Peakfläche 1.659.000). Für die Berechnungen wurde die 1:10 verdünnte Probe herangezogen.

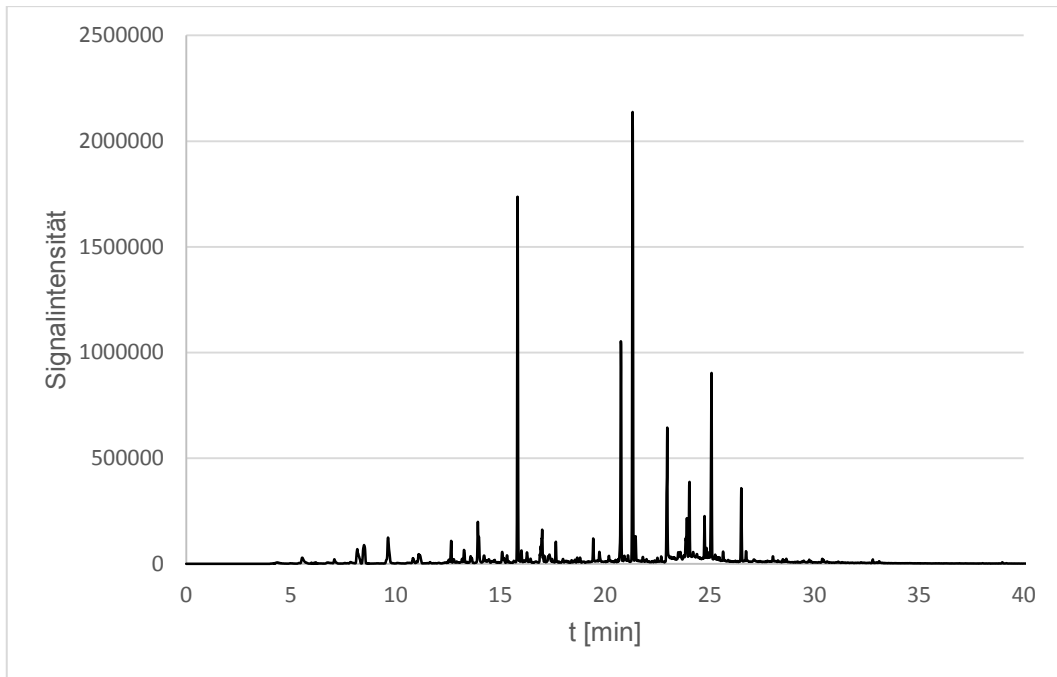


Abbildung 75: Chromatogramm des Extrakts eines großen Blattes von *S. officinale*. Heliotridin eluierte nach 15,8 min (Peakfläche 4.315.000). Retronecin wurde nicht detektiert. Kleine Peaks im Bereich der typischen Retentionszeit zeigen nicht das richtige Massenspektrum.

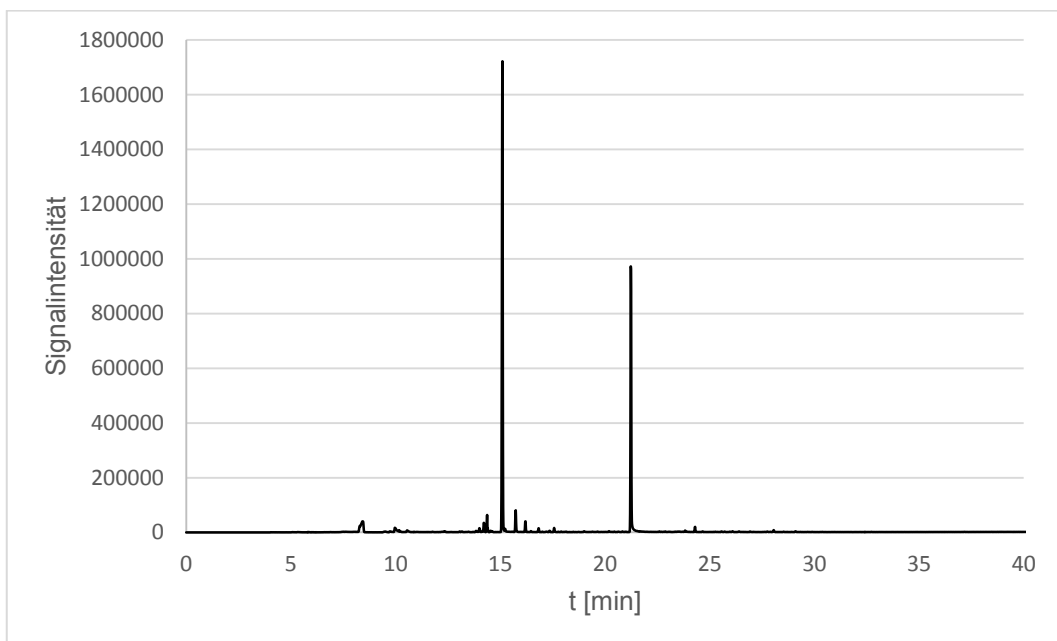


Abbildung 76: Chromatogramm des Extrakts aus feinen Wurzeln von *S. officinale*. Die Probe wurde 1:10 mit Essigsäureethylester verdünnt. Retronecin eluierte bei 15,1 min (Peakfläche 4.685.000), Heliotridin bei 15,7 min (Peakfläche 214.726). Für die Berechnungen wurde eine 1:50 verdünnte Probe herangezogen.

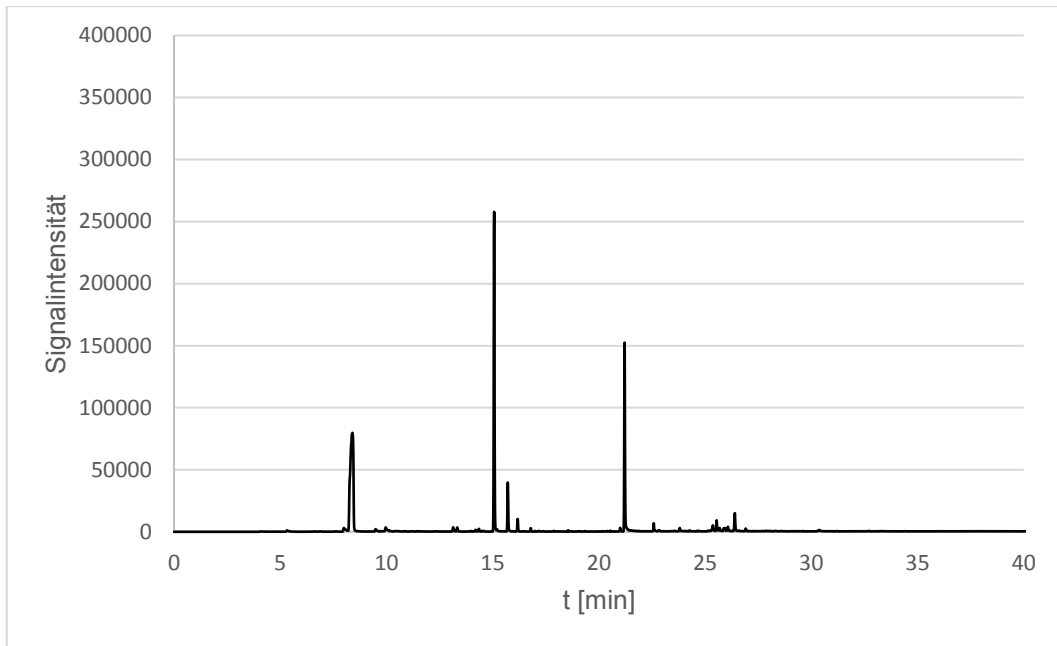


Abbildung 77: Chromatogramm des Extrakts aus mittleren Wurzeln von *S. officinale*. Die Probe wurde 1:10 mit Essigsäureethylester verdünnt. Retronecin eluierte bei 15,1 min (Peakfläche 624.203), Heliotridin bei 15,7 min (Peakfläche 104.571).

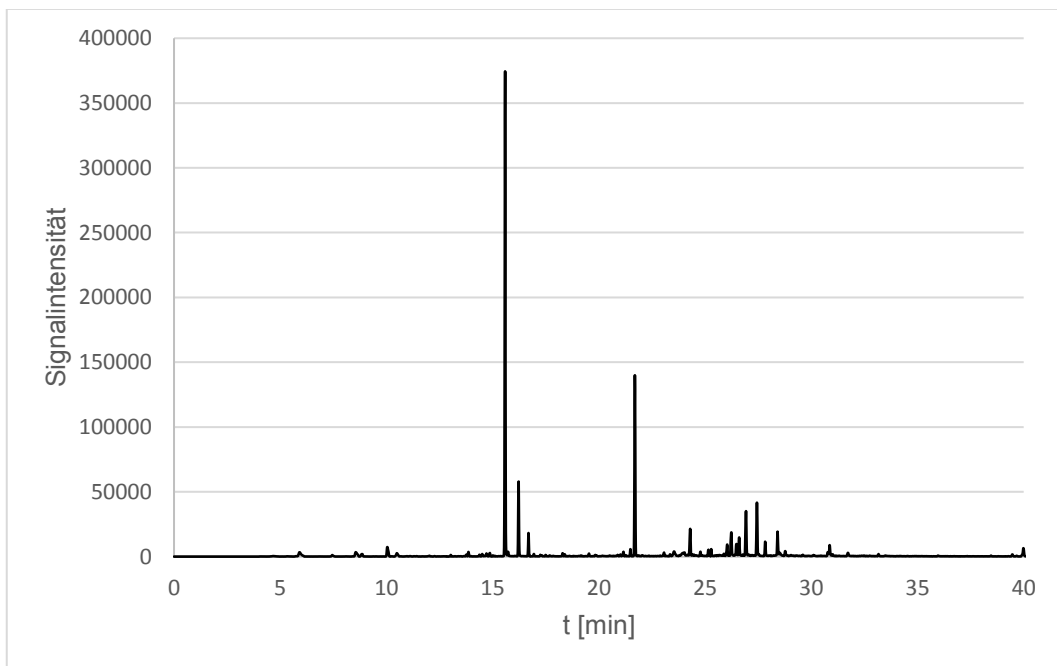


Abbildung 78: Chromatogramm des Extrakts aus dicken Wurzeln von *S. officinale*. Retronecin eluierte bei 15,6 min (Peakfläche 817.184), Heliotridin bei 16,2 min (Peakfläche 134.653).

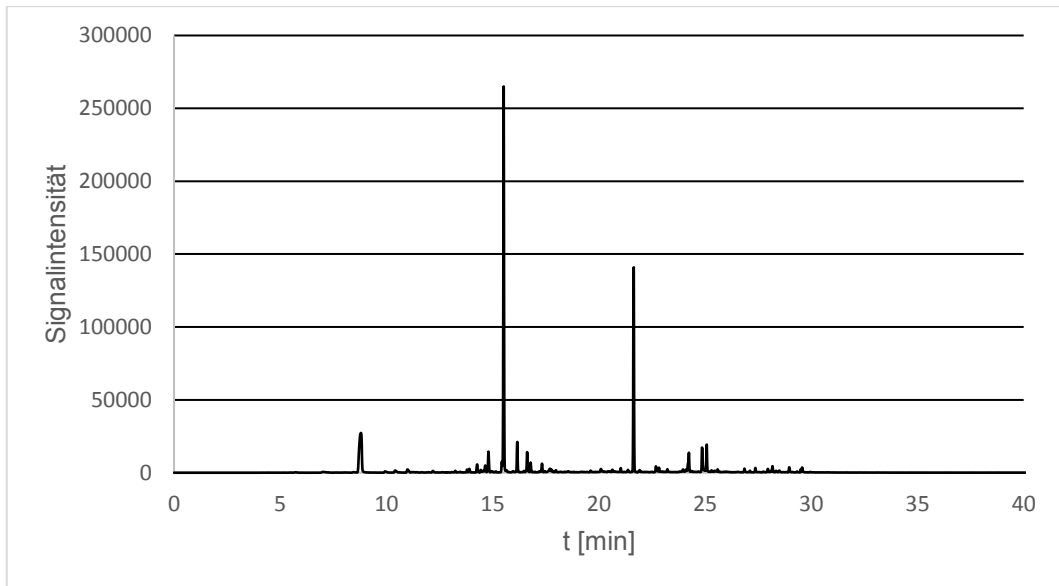


Abbildung 79: Chromatogramm eines Extrakts von *S. officinale* Haarwurzeln (SOHR-14). Die Probe wurde 1:10 mit Essigsäureethylester verdünnt. Retronecin eluierte bei 15,5 min (Peakfläche 604.065), Heliotridin bei 16,2 min (Peakfläche 49.780).

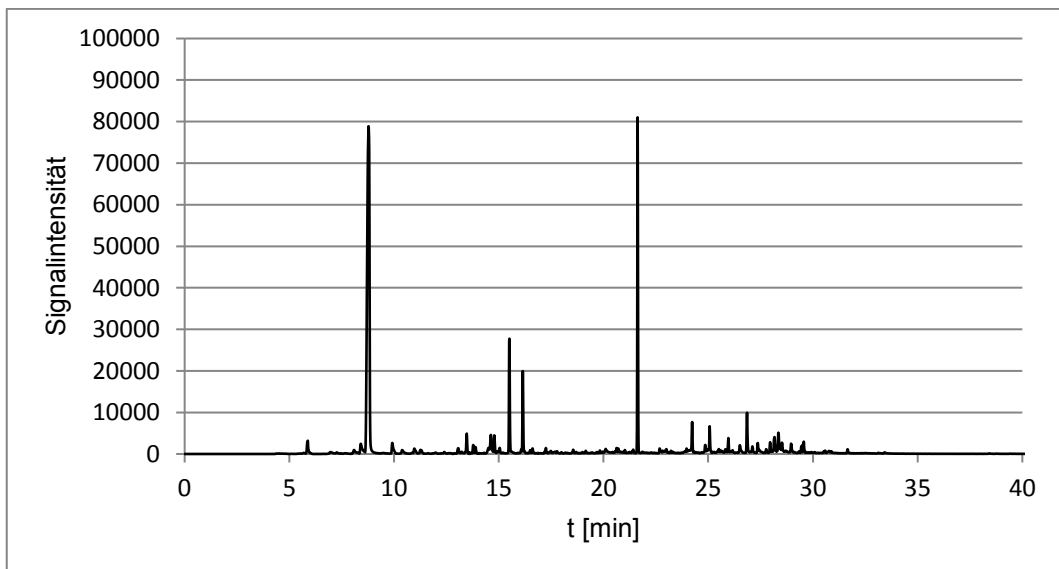


Abbildung 80: Chromatogramm eines Extrakts von *S. officinale* Haarwurzeln (SOHR-17). Die Probe wurde 1:10 mit Essigsäureethylester verdünnt. Retronecin eluierte bei 15,5 min (Peakfläche 75.667), Heliotridin bei 16,2 min (Peakfläche 46.596).

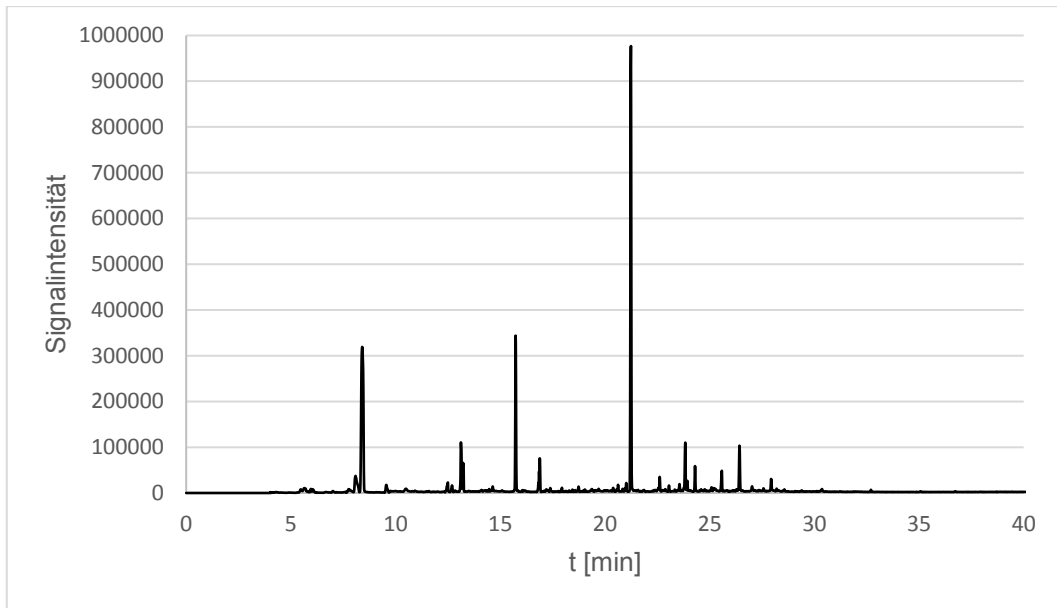


Abbildung 81: Chromatogramm eines Extrakts von bei Licht kultiviertem *S. officinale* Kallus. Heliotridin eluierte nach 15,7 min (Peakfläche 825.015). Retronecin wurde nicht detektiert. Kleine Peaks im Bereich der typischen Retentionszeit zeigen nicht das richtige Massenspektrum.

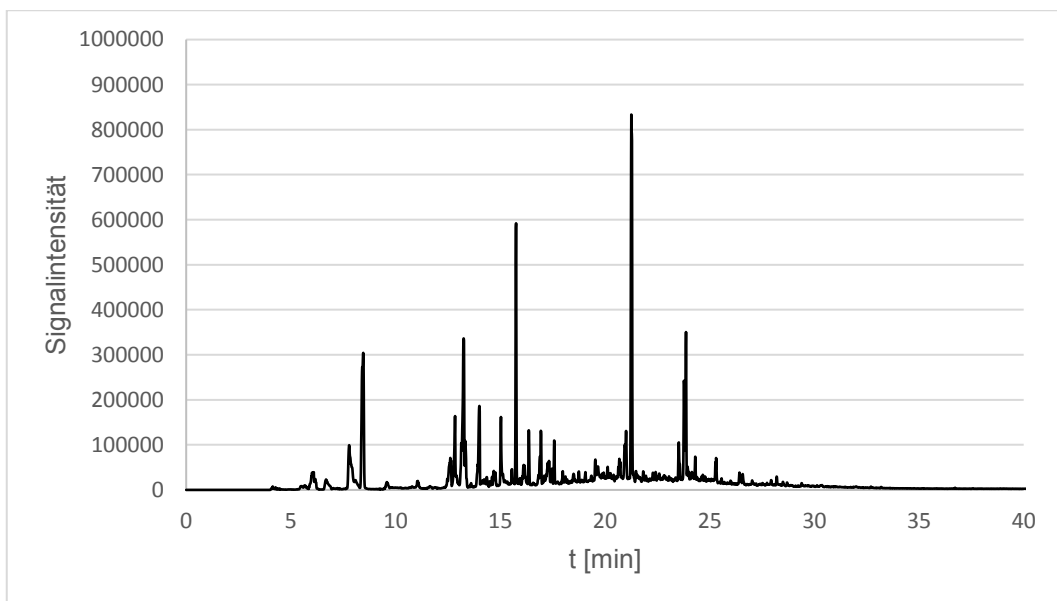


Abbildung 82: Chromatogramm eines Extrakts von bei Dunkelheit kultiviertem *S. officinale* Kallus. Heliotridin eluierte nach 15,7 min (Peakfläche 1.461.000). Retronecin wurde nicht detektiert. Kleine Peaks im Bereich der typischen Retentionszeit zeigen nicht das richtige Massenspektrum.

7.4. Vergleich der *HSS*-Expression mit dem PA-Gehalt

Tabelle 19: PA-Gehalt und *HSS*-Kopienzahl der Haarwurzelproben. Dargestellt sind die Daten für alle Proben, die in die Analyse in 3.4 eingingen. Die Spalte „Abweichung %“ enthält dabei die Differenz zwischen den als Anteil vom Maximalwert berechneten Werten (% Kopienzahl - % PA-Gehalt). Abweichungen ≥ 20 Prozentpunkte wurden als deutliche Abweichung zwischen beiden Größen interpretiert (rot). Positive Differenzen zeigen eine höhere relative Kopienzahl, verglichen mit dem PA-Gehalt. Bei negativen Differenzen ist das Verhältnis umgekehrt.

Probe	A			B			C		
Linie	HSS/1000 Actin	µg/g PA- Verh	Abweichung %	HSS/1000 Actin	µg/g PA- Verh	Abweichung %	HSS/1000 Actin	µg/g PA- Verh	Abweichung %
SOHR-1	290	1125,8	-8,1	160	484,2	2,5	592	326,1	83,4
SOHR-5	475	189,9	70,5	406	185,7	59,1	368	366,6	43,5
SOHR-9	479	1577,4	0,8	412	404,0	49,1	545	251,8	79,4
SOHR-14	211	315,8	19,7	137	1091,8	-32,3	141	802,0	-16,9
SOHR-16	300	363,4	32,3						
SOHR-17	12	970,7	-47,1	30	105,1	-0,3	101	691,7	-18,0
SOHR-22	60	342,1	-7,3						
SO-32-0-HR-1	158	1970,9	-73,3	16	355,0	-15,3	88	81,2	10,7
SO-32-0-HR-2	149	456,7	2,0						
SO-32-0-HR-3	53	285,3	-5,6	28	79,0	0,8	26	50,0	1,8
SO-32-0-HR-4	29	863,3	-38,8						
SO-32-0-HR-5	10	920,2	-44,9	123	63,4	17,6	80	156,5	5,6
SO-32-0-HR-6	19	154,9	-4,6	19	37,2	1,3	140	80,4	19,6
SO-HSS1a-HR-1	7	155,1	-6,6	50	64,6	5,2	42	30,7	5,6
SO-HSS1a-HR-2	57	211,5	-1,1	112	56,9	16,0	39	78,4	2,5
SO-HSS1a-HR-5	42	640,9	-25,4						
SO-HSS1a-HR-6	15	756,2	-35,9	28	635,7	-27,5	48	225,3	-3,3

SO-HSS1a-HR-7	161	1210,2	-34,1	232	125,9	32,8	199	224,3	22,2
SO-HSS1a-HR-8	26	695,0	-30,9						
SO-HSS1a-HR-9	244	988,7	-9,0	313	636,6	20,6	209	578,1	5,9
SO-HSS1a-HR-12	16	474,0	-21,4						
SO-HSS1a-HR-14	64	568,6	-18,0						
SO-HSS1a-HR-25	73	1008,0	-38,8	85	100,9	9,3	77	497,0	-12,3
SO-HSS2-HR-1	6	54,0	-1,6	81	342,8	-3,8	33	299,4	-9,6
SO-HSS2-HR-3	64	282,3	-3,6						
SO-HSS2-HR-4	50	257,8	-4,6	49	315,7	-7,8	37	312,8	-9,6
SO-HSS2-HR-5	75	180,8	3,5	145	583,8	-5,2	101	254,3	4,2
SO-HSS2-HR-6	42	360,8	-11,2	50	199,5	-1,6	84	389,9	-5,5
SO-HSS4a-HR-3	19	204,5	-7,2	316	956,9	4,8	484	1783,4	-8,7
SO-HSS4a-HR-4	173	296,1	14,2	335	1470,1	-18,0	118	514,0	-6,2
SO-HSS4a-HR-5	67	1639,0	-71,8	208	257,2	22,0	241	328,7	24,1

Eidesstattliche Versicherung

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie der Technischen Universität Dresden unter Leitung von Frau Prof. Dr. Jutta Ludwig-Müller angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Promotionsordnung des Bereichs Mathematik und Naturwissenschaften der TU Dresden erkenne ich an.

Dresden, den

Annemarie Lippert